

Peran Komunitas Bakteri dalam Pembentukan Rasa Pahit pada Tempe: Analisis Mikrobiologi dan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP)

TATI BARUS



**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2008**

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi Peran Komunitas Bakteri dalam Pembentukan Rasa Pahit pada Tempe: Analisis Mikrobiologi dan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) adalah karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Jakarta, Juli 2008

Tati Barus
NIM G361030111



Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

ABSTRACT

TATI BARUS. Role of Bacterial Community in Tempe Bitter Taste Formation: Microbiological and Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis. Under direction of ANTONIUS SUWANTO, ARIS TRI WAHYUDI, and C. HANNY WIJAYA.

Soybean tempe, referred to as tempe, is an indigenous fermented food of Indonesia. It has a variety of tastes, sometimes with a hint of bitterness, which may differ in intensity. The cause of bitterness in tempe has never been reported previously. Thus, the aim of this study is to investigate the role of bacteria community in the formation of bitter taste in tempe. Sensory test was carried out in order to determine the scores of bitterness intensity in tempe. Sensory test on EMP, WJB, CLR, DRG, and MLB tempe showed that EMP tempe had the highest score of bitterness (2.3) and WJB had the lowest (1.3). The intensity of bitterness in EMP and WJB was significantly different, which was not directly caused by the processing method. It was also revealed that the mould had no impact on the difference of bitterness intensity in EMP and WJB. *Rhizopus oligosporus* and *Mucor* sp. were isolated from both EMP and WJB tempe with abundance, i.e 3.4×10^5 and 3.5×10^3 CFU g^{-1} in EMP; and 3.8×10^5 and 4.8×10^3 CFU g^{-1} in WJB. The difference in the abundance and the types of bacteria found in EMP and WJB tempe may result in the difference of bitterness intensity. Plating analysis showed that soaking water and fresh tempe of EMP contained a higher number of bacteria than WJB. Soaking water of EMP tempe contained a higher number of *Enterobacteria*, approximately 5×10^3 fold, and spore-forming bacteria groups 3×10^2 fold compared to WJB. Similarly, the number of total mesophilic bacteria, *Enterobacteria*, and spore-forming bacteria in fresh EMP tempe are 5×10^2 , 2×10^2 and 2×10^1 fold, respectively, higher than those in fresh WJB tempe. Based on the sequencing of 16S rRNA gene, the dominant mesophilic bacteria grown on PCA media in EMP tempe were *Acetobacter indonesiensis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella* sp., and *Flavobacterium* sp. while those in WJB tempe were *Klebsiella* sp., *Bacillus pumilus*, *Brevundimonas* sp., *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas putida*. *Bacillus*, a group of proteolytic bacteria, was found at 9×10^4 fold higher in the soaking water of EMP compared to the one of WJB. Based on bacterial community analysis using T-RFLP, it was also shown that bacterial abundance in soaking water of EMP tempe is 40%-119% higher. The major difference (119%) was found after 7 hours soaking. Similarly, bacterial abundance in fresh EMP tempe was 62% higher than the one in fresh WJB tempe. Bacterial communities in EMP and WJB tempe were also dominated by different types of bacteria. T-RFLP results also demonstrated that the types of bacteria involved during tempe processing consisted of both culturable and unculturable bacteria. The latter group was more dominant compared to the former.

Keywords: tempe, bitter taste, bacteria community analysis, T-RFLP

RINGKASAN

TATI BARUS. Peran Komunitas Bakteri dalam Pembentukan Rasa Pahit pada Tempe: Analisis Mikrobiologi dan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*(T-RFLP). Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO, ARIS TRI WAHYUDI, dan C. HANNY WIJAYA.

Tempe kedelai atau lebih dikenal dengan sebutan tempe merupakan produk pangan fermentasi tradisional masyarakat Indonesia. Cita rasa tempe sangat beragam, bahkan pada tempe tertentu ditemukan cita rasa yang tidak disenangi oleh konsumen seperti rasa pahit. Intensitas rasa pahit pada tempe dapat berbeda antar jenis tempe yang diproduksi pengrajin dan belum pernah dilaporkan faktor penyebabnya.

Pada proses pembuatan tempe, mikroorganisme utama yang berperan adalah *Rhizopus oligosporus*, namun bakteri ditemukan juga dalam jumlah dan keragaman yang tinggi. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji apakah komunitas bakteri berperan dalam pembentukan rasa pahit pada tempe. Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk meningkatkan cita rasa tempe.

Serangkaian eksperimen dilakukan, yaitu untuk: mendapatkan contoh tempe "pahit" dan "tidak pahit" melalui uji sensori terhadap beberapa jenis tempe, menguji pengaruh perbedaan cara pengolahan terhadap rasa pahit pada tempe, menganalisis pengaruh jenis kapang terhadap terbentuknya rasa pahit pada tempe, dan menganalisis pengaruh komunitas bakteri terhadap rasa pahit pada tempe. Metode analisis komunitas bakteri dilakukan dengan teknik pengkulturan (konvensional) dan teknik molekular, yaitu dengan teknik T-RFLP. Teknik T-RFLP ini digunakan untuk menganalisis komunitas bakteri melalui analisis gen 16S rRNA.

Hasil uji sensori rasa pahit lima jenis tempe dengan kode EMP, WJB, CLR, DRG, dan MLB menunjukkan bahwa tempe EMP memiliki skor intensitas rasa pahit tertinggi (2.3) dan signifikan berbeda dibandingkan dengan skor intensitas rasa pahit tempe WJB yang memiliki skor terendah (1.3).

Perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB bukan disebabkan secara langsung oleh perbedaan cara pengolahan. Selain itu, perbedaan tersebut bukan disebabkan juga oleh kapang. Pada tempe EMP

ditemukan *R. oligosporus* (3.4×10^5 CFU g^{-1}) dan *Mucor* sp. (3.5×10^3 CFU g^{-1}), dan pada WJB ditemukan *R. oligosporus* (3.8×10^5 CFU g^{-1}) dan *Mucor* sp. (4.8×10^3 CFU g^{-1}).

Kelimpahan sel bakteri selama proses pengolahan tempe EMP lebih banyak dibandingkan dengan tempe WJB. Berdasarkan analisis komunitas bakteri secara konvensional pada air rendaman ditemukan kelimpahan *Enterobacteria* sekitar 5×10^3 kali lebih banyak pada tempe EMP dibandingkan WJB. Demikian juga bakteri berspora, sekitar 3×10^2 kali lebih banyak pada tempe EMP dibandingkan WJB. Pada tempe segar, total bakteri mesofil, *Enterobacteria*, dan bakteri berspora secara berturut-turut sekitar 5×10^2 , 2×10^2 , dan 2×10^1 kali lebih banyak pada tempe EMP dibandingkan WJB.

Jenis bakteri dominan yang berhasil dikultur selama proses pengolahan tempe EMP adalah *Acetobacter indonesiensis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*., dan *Flavobacterium* sp., dan selama proses pengolahan tempe WJB adalah *Klebsiella* sp., *Bacillus pumilus*, *Brevundimonas* sp., *Acinetobacter* sp., dan *Pseudomonas putida*. *Bacillus* pada kedua jenis tempe tersebut bersifat proteolitik, dan kelimpahannya sekitar 9×10^4 kali lebih banyak pada air rendaman tempe EMP dibandingkan dengan WJB.

Kelimpahan sel bakteri selama proses pengolahan tempe EMP lebih banyak dibandingkan dengan tempe WJB ditemukan juga berdasarkan analisis komunitas bakteri dengan teknik T-RFLP. Kelimpahan sel bakteri air rendaman kedelai tempe EMP lebih banyak sekitar 40%-119%. Perbedaan terbesar (119%) ditemukan setelah tujuh jam perendaman kedelai. Demikian juga kelimpahan sel bakteri tempe segar EMP ditemukan lebih banyak sekitar 62% dibandingkan dengan tempe segar WJB. Analisis komunitas bakteri dengan teknik T-RFLP menunjukkan bahwa jenis bakteri yang terdapat selama proses pengolahan tempe EMP dan WJB pada umumnya berbeda. Perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB kemungkinan besar disebabkan karena perbedaan kelimpahan dan perbedaan jenis bakteri yang terdapat selama proses pengolahan berlangsung.

Berdasarkan analisis komunitas bakteri dengan teknik T-RFLP ditemukan bahwa jenis bakteri yang terdapat selama proses pengolahan tempe EMP dan

tempe WJB terdiri atas jenis bakteri yang bersifat *culturable* dan *unculturable*, dan jenis bakteri yang bersifat *unculturable* lebih dominan dibandingkan dengan jenis bakteri yang bersifat *culturable*.

Kata kunci: tempe, rasa pahit, komunitas bakteri, T-RFLP

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

- . Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

RINGKASAN (Sebelum perbaikan dari ibu Hanny W)

TATI BARUS. Peran Komunitas Bakteri dalam Pembentukan Rasa Pahit pada Tempe: Analisis Mikrobiologi dan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*(T-RFLP). Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO, ARIS TRI WAHYUDI, dan C. HANNY WIJAYA.

Tempe merupakan makanan tradisional masyarakat Indonesia yang diolah melalui proses fermentasi. Berbagai-bagai bahan baku dapat diolah menjadi tempe, namun yang paling terkenal adalah kedelai. Tempe yang dimaksud pada tulisan ini adalah tempe kedelai yang selanjutnya disebut tempe.

Cita rasa tempe sangat beragam, namun pada jenis tempe tertentu dapat ditemukan cita rasa yang tidak disenangi oleh konsumen. Salah satu diantaranya ialah rasa pahit. Intensitas rasa pahit pada tempe dapat berbeda antar jenis tempe yang diproduksi pengrajin dan belum pernah dilaporkan faktor penyebabnya.

Mikroorganisme utama yang berperan pada proses pembuatan tempe adalah *Rhizopus oligosporus*, namun bakteri juga sangat berperan. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji apakah bakteri berperan dalam pembentukan rasa pahit pada tempe. Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk meningkatkan cita rasa tempe.

Serangkaian eksperimen dilakukan, yaitu untuk: mendapatkan contoh tempe "pahit" dan "tidak pahit" melalui uji sensori terhadap beberapa jenis tempe, menguji pengaruh perbedaan cara pengolahan terhadap rasa pahit pada tempe, menganalisis pengaruh jenis kapang terhadap terbentuknya rasa pahit pada tempe, dan menganalisis pengaruh komunitas bakteri terhadap rasa pahit pada tempe. Metode analisis komunitas bakteri dilakukan dengan teknik pengkulturan (konvensional) dan teknik molekular, yaitu dengan teknik T-RFLP. Teknik T-RFLP ini digunakan untuk menganalisis komunitas bakteri melalui analisis gen 16S rRNA.

Hasil uji sensori rasa pahit lima jenis tempe (EMP, WJB, CLR, DRG, dan MLB) menunjukkan bahwa tempe EMP memiliki skor intensitas rasa pahit

tertinggi (2.3) dan signifikan berbeda dibandingkan dengan skor intensitas rasa pahit tempe WJB yang memiliki skor terendah (1.3).

Perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB tidak disebabkan oleh jenis kedelai sebab kedua jenis tempe diproduksi oleh pengrajin dari jenis kedelai yang sama. Perbedaan intensitas rasa pahit antara kedua jenis tempe tersebut bukan *juga* disebabkan oleh perbedaan cara pengolahan. *Hal ini karena hasil uji sensori dua jenis tempe yang diproduksi pada skala laboratorium dengan cara pengolahan tempe EMP dan WJB menunjukkan skor intensitas rasa pahit yang tidak signifikan berbeda, yaitu masing-masing dengan skor 1.1 dan 1.2.*

Perbedaan skor intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB bukan disebabkan oleh kapang, sebab jenis kapang pada tempe EMP dan WJB sama. Pada tempe EMP ditemukan *R. oligosporus* (3.4×10^5 CFU g^{-1}) dan *Mucor* sp. (3.5×10^3 CFU g^{-1}), dan pada WJB ditemukan *R. oligosporus* (3.8×10^5 CFU g^{-1}) dan *Mucor* sp. (4.8×10^3 CFU g^{-1}). *Hasil uji sensori tempe yang diproduksi menggunakan inokulum dari pengrajin tempe EMP dan WJB menunjukkan skor intensitas rasa pahit yang tidak signifikan berbeda, yaitu masing-masing dengan skor 1.1 dan 1.2.*

Kelimpahan sel bakteri selama proses pengolahan tempe EMP lebih banyak dibandingkan dengan tempe WJB. Berdasarkan analisis komunitas bakteri secara konvensional pada air rendaman ditemukan kelimpahan *Enterobacteria* sekitar 5×10^3 kali lebih banyak pada EMP dibandingkan WJB. Demikian juga bakteri berspora, sekitar 3×10^2 kali lebih banyak pada EMP dibandingkan WJB. Pada tempe segar, total bakteri mesofil, *Enterobacteria*, dan bakteri berspora secara berturut-turut sekitar 5×10^2 , 2×10^2 , dan 2×10^1 kali lebih banyak pada tempe EMP dibandingkan tempe WJB.

Jenis bakteri dominan yang berhasil dikultur selama proses pengolahan tempe EMP adalah *Acetobacter indonesiensis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*., dan *Flavobacterium* sp., dan selama proses pengolahan tempe WJB adalah *Klebsiella* sp., *Bacillus pumilus*, *Brevundimonas* sp., *Acinetobacter* sp., dan *Pseudomonas putida*. *Bacillus* pada kedua jenis tempe tersebut bersifat

proteolitik, dan kelimpahannya sekitar 9×10^4 kali lebih banyak pada air rendaman tempe EMP dibandingkan dengan WJB.

Kelimpahan sel bakteri selama proses pengolahan tempe EMP lebih tinggi dibandingkan dengan tempe WJB ditemukan juga berdasarkan analisis komunitas bakteri dengan teknik T-RFLP. Kelimpahan sel bakteri air rendaman kedelai tempe EMP lebih tinggi sekitar 40%-119%. Perbedaan terbesar (119%) ditemukan setelah tujuh jam perendaman kedelai. Demikian juga kelimpahan sel bakteri tempe segar EMP ditemukan lebih tinggi sekitar 62% dibandingkan dengan tempe segar WJB. Analisis komunitas bakteri dengan teknik T-RFLP menunjukkan bahwa jenis bakteri yang terdapat selama proses pengolahan tempe EMP dan tempe WJB pada umumnya berbeda. Perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB disebabkan karena perbedaan kelimpahan dan jenis bakteri yang terdapat selama proses pengolahan berlangsung.

Berdasarkan analisis komunitas bakteri dengan teknik T-RFLP ditemukan bahwa jenis bakteri yang terdapat selama proses pengolahan tempe EMP dan tempe WJB terdiri atas jenis bakteri yang bersifat *culturable* dan *unculturable*, dan jenis bakteri yang bersifat *unculturable* lebih dominan dibandingkan dengan jenis bakteri yang bersifat *culturable*.

Kata kunci: tempe, rasa pahit, komunitas bakteri, T-RFLP

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

©Hak Cipta milik IPB, tahun 2008
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh Karya tulis dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

Peran Komunitas Bakteri dalam Pembentukan Rasa Pahit pada Tempe: Analisis Mikrobiologi dan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP)

TATI BARUS

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor pada
Program Studi Biologi

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2008**

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

- . Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Penguji pada Ujian Tertutup : Dr. Anja Meryandini, MS.

Penguji pada Ujian Terbuka : Prof. Dr. Indrawati Gandjar
Dr. Ir. Gayuh Rahayu

Judul Penelitian : Peran Komunitas Bakteri dalam Pembentukan Rasa Pahit pada Tempe: Analisis Mikrobiologi dan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP)
Nama : Tati Barus
NIM : G361030111

Disetujui
Komisi Pembimbing

Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc
Ketua

Dr. Aris Tri Wahyudi, MSi
Anggota

Prof. Dr. Ir. C. Hanny Wijaya, M.Sc
Anggota

Mengetahui

Ketua Program Studi Biologi

Dekan Sekolah Pascasarjana

Dr. Ir. Dedy Duryadi S., DEA

Prof. Dr.Ir. Khairil Anwar Notodiputro, M.S

Tanggal Ujian: 14 Juli 2008

Tanggal Lulus: 14 Juli 2008

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala karuniaNya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Penelitian ini dilaksanakan sejak Oktober 2005 sampai dengan Desember 2007 dengan judul Peran Komunitas Bakteri dalam Pembentukan Rasa Pahit pada Tempe: Analisis Mikrobiologi dan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP).

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, MSc., Dr. Aris Tri Wahyudi, MSi., dan Prof. Dr. Ir. C. Hanny Wijaya, MSc. selaku pembimbing yang telah banyak memberikan masukan yang sangat berharga selama penelitian berlangsung hingga penulisan disertasi ini. Selain itu, kepada Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, MSc. penulis mengucapkan terima kasih atas segala bantuan dana, bahan, dan alat yang digunakan untuk penelitian ini. Selanjutnya, penulis mengucapkan terima kasih juga kepada: Dr. Ir. Suharyadi, MS dan semua pimpinan Universitas Mercu Buana yang telah berkenan memberikan bantuan dana penelitian, Dr. Any Fitriani, MSi atas kerjasamanya yang baik selama bekerja di laboratorium *Research Center for Microbial Diversity* (RCMD), dan Bapak Husen sebagai laboran di RCMD. Ungkapan terima kasih yang tulus dan setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada suamiku tercinta Drs. Kuasa Sembiring, MM., anaku: Dian, Atan dan Amelia, kedua orang tuaku tercinta dan saudara-saudaraku khususnya kakak Rasmi Barus (alm), serta semua keluarga atas segala dorongan semangat, pengertian, dan doanya. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Jakarta, Juli 2008

Tati Barus

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Lubuk Pakam pada tanggal 5 Nopember 1964 dari pasangan Ngulih Barus dan Rohani br. Tarigan. Pendidikan sarjana ditempuh di Program Studi Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, lulus pada tahun 1989. Pada tahun 1997, penulis diterima di Program Studi Agronomi dan Hortikultura pada Sekolah Pascasarjana IPB dan menamatkannya pada tahun 2000. Kesempatan untuk melanjutkan ke program doktor pada Program Studi Biologi, Subprogram Studi Mikrobiologi pada perguruan tinggi yang sama diperoleh pada tahun 2003. Beasiswa pendidikan pascasarjana diperoleh dari Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia dan Universitas Mercu Buana.

Penulis bekerja sebagai dosen tetap di Fakultas Pertanian Universitas Mercu Buana di Jakarta sejak tahun 1990 sampai Oktober 2007. Sejak Nopember 2007 penulis bekerja sebagai dosen tetap di Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya di Jakarta.

Selama mengikuti program S3, penulis menjadi anggota Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia. Karya ilmiah berjudul *Role of bacteria in tempeh bitter taste formation: microbiological and molecular biological analyses based on 16S rRNA gene* akan diterbitkan pada jurnal *Microbiology Indonesia* Volume 2, No. 1, 2008. Karya ilmiah tersebut merupakan bagian dari disertasi S3 penulis.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
PENDAHULUAN.....	1
Latar Belakang.....	1
Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	3
TINJAUAN PUSTAKA.....	5
Keunggulan Tempe Sebagai Bahan Makanan.....	5
Proses Pembuatan Tempe.....	6
Mikroorganisme pada Tempe.....	8
Peran Bakteri dalam Cita Rasa Bahan Pangan Fermentasi.....	9
Analisis Komunitas Bakteri dengan <i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>	12
BAHAN DAN METODE.....	16
Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
Bahan dan Alat.....	16
Metodologi.....	17
Pengadaan Sampel Tempe.....	18
Uji Sensori Rasa Pahit Tempe.....	18
Pengolahan Tempe	20
Analisis Kapang.....	20
Analisis Bakteri Secara Konvensional.....	20
Identifikasi Bakteri yang dapat Dikulturkan Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA.....	21
Isolasi DNA Genom Langsung dari Sampel.....	22
Amplifikasi Gen 16S rRNA.....	22
Pemotongan Amplikon dengan Enzim Restriksi.....	23
Analisis T-RFLP.....	23
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
Uji Sensori Rasa Pahit Tempe.....	25
Pengaruh Perbedaan Proses Pembuatan terhadap Rasa Pahit Tempe	26
Kondisi Umum Proses Pembuatan Tempe EMP dan Tempe WJB.....	28
Jumlah dan Jenis Kapang.....	31
Analisis Komunitas Bakteri Secara Konvensional.....	34
Analisis Komunitas Bakteri dengan Teknik T-RFLP.....	38
KESIMPULAN DAN SARAN.....	59
Kesimpulan.....	59
Saran.....	60

DAFTAR PUSTAKA..... 61
LAMPIRAN..... 67

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

- . Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
- 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Keadaan umum proses pengolahan tempe EMP dan tempe WJB.....	29
2. Kelimpahan beberapa jenis bakteri yang terdapat pada air rendaman dan tempe segar EMP dan WJB.....	35
3. Dua jenis bakteri yang dominan dari EMP dan WJB yang tumbuh pada media PCA.....	37
4. Jenis TRF (bp) gen 16S rRNA komunitas bakteri dari air rendaman dan tempe segar EMP dan WJB yang dipotong dengan enzim restriksi <i>Bst</i> UI.....	47
5. Jenis TRF yang sama yang ditemukan pada tempe EMP dan tempe WJB	48
6. Persentase ketinggian kelimpahan bakteri tempe EMP dibandingkan tempe WJB.	50
7. Kemungkinan jenis bakteri yang dominan pada tempe EMP berdasarkan analisis T-RFLP menggunakan enzim <i>Bst</i> UI.....	54
8. Kemungkinan jenis bakteri yang dominan pada tempe WJB berdasarkan analisis T-RFLP menggunakan enzim <i>Bst</i> UI.....	55
9. Persentase kelimpahan dua jenis bakteri tempe EMP hasil pengkulturan pada media PCA yang terdapat pada kemungkinan jenis bakteri hasil pencocokan TRF dengan <i>database</i>	57
10. Persentase kelimpahan dua jenis bakteri tempe WJB hasil pengkulturan pada media PCA yang terdapat pada kemungkinan jenis bakteri hasil pencocokan TRF dengan <i>database</i>	57

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Bagan alir teknologi pembuatan tempe (Hermana & Karmini 1996)...	7
2. Ilustrasi prinsip kerja analisis komunitas mikroorganismen menggunakan analisis <i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (http://www.bibliographics.com/LAB/T-RFLP.htm)...	14
3. Tahapan kerja penelitian.....	17
4. Skor intensitas rasa pahit beberapa jenis tempe.....	25
5. Skema pembuatan tempe yang dilakukan oleh pengrajin tempe EMP, DRG, MLB, CLR (A) dan WJB (B).....	27
6. pH air rendaman kedelai tempe EMP dan tempe WJB selama 14 jam proses perendaman.....	30
7. Penampilan kedelai tempe EMP yang telah direndam (A), kedelai tempe WJB yang telah direndam (B), tempe segar EMP (C), dan tempe segar WJB (D).....	31
8. Elektroforesis gel agarose (0.8%) DNA gen penyandi 16S rRNA komunitas bakteri dari tempe EMP dan WJB.....	39
9. Contoh hasil analisis komunitas bakteri dengan T-RFLP. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).....	41
10. Profil TRF gen 16S rRNA bakteri AE1 (1 jam perendaman kedelai tempe EMP) dan AW1 (1 jam perendaman kedelai tempe WJB) yang dipotong dengan enzim restriksi <i>Bst</i> UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).....	43
11. Profil TRF gen 16S rRNA bakteri AE2 (7 jam perendaman kedelai tempe EMP) dan AW2 (7 jam perendaman kedelai tempe WJB) yang dipotong dengan enzim restriksi <i>Bst</i> UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).....	44
12. Profil TRF gen 16S rRNA bakteri AE3 (14 jam perendaman kedelai tempe EMP) dan AW3 (14 jam perendaman kedelai tempe WJB) yang dipotong dengan enzim restriksi <i>Bst</i> UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas	

	pendaran TRF (unit fluoresens).....	45
13.	Profil TRF gen 16S rRNA bakteri Tempe segar EMP dan tempe segar WJB yang dipotong dengan enzim restriksi <i>Bst</i> UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).	46
14.	Persentase kelimpahan jenis bakteri tempe EMP dan tempe WJB.....	48
15.	Total intensitas TRF pada air rendaman kedelai dan tempe segar EMP dan WJB yang dipotong dengan <i>Bst</i> UI.....	49

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

- . Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
- 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Hasil analisis T-RFLP air rendaman pertama (AE1) tempe EMP yang dipotong dengan enzim <i>Bst</i> UI.....	68
2. Hasil analisis T-RFLP air rendaman kedua (AE2) tempe EMP yang dipotong dengan enzim <i>Bst</i> UI.....	69
3. Hasil analisis T-RFLP air rendaman ketiga (AE3) tempe EMP yang dipotong dengan enzim <i>Bst</i> UI.....	70
4. Hasil analisis T-RFLP tempe segar EMP (TE) yang dipotong dengan enzim <i>Bst</i> UI.....	71
5. Hasil analisis T-RFLP air rendaman pertama (AW1) tempe WJB yang dipotong dengan enzim <i>Bst</i> UI.....	72
6. Hasil analisis T-RFLP air rendaman kedua (AW2) tempe WJB yang dipotong dengan enzim <i>Bst</i> UI.....	73
7. Hasil analisis T-RFLP air rendaman ketiga (AW3) tempe WJB yang dipotong dengan enzim <i>Bst</i> UI.....	74
8. Hasil analisis T-RFLP tempe segar WJB (TW) yang dipotong dengan enzim <i>Bst</i> UI.....	75
9. Contoh formulir pengujian intensitas rasa pahit tempe.....	76
10. Contoh formulir uji penentuan rasa dasar.....	77
11. Contoh formulir uji segitiga rasa.....	78
12. Contoh formulir uji ranking rasa pahit.....	79

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Tempe merupakan makanan tradisional masyarakat Indonesia yang dibuat melalui proses fermentasi terutama oleh *Rhizopus oligosporus*. Ada bermacam-macam jenis tempe yang bergantung pada bahan baku yang digunakan, namun yang paling terkenal ialah tempe berbahan baku kedelai (Winarno 1985). Tempe yang dimaksud pada tulisan ini adalah tempe berbahan baku kedelai yang selanjutnya disebut tempe.

Tempe merupakan makanan sehat karena mengandung gizi yang baik untuk kesehatan. Tempe dapat mencegah anemia (Astuti 1999b) dan diare (Sudigbia 1999). Tempe mengandung vitamin B₁₂ (Keuth & Bisping 1994) yang jarang terdapat pada bahan pangan nabati, dan mengandung senyawa antioksidan (Esaki *et al.* 1996). Oleh sebab itu, saat ini tempe tidak saja populer di Indonesia tetapi sudah berkembang ke luar negeri seperti Jepang, Belanda, dan Amerika. Bahkan di Jepang telah terbentuk *Japanese Society of Tempeh* yang didirikan oleh salah seorang ilmuwan yang banyak meneliti tentang tempe (Karyadi 1996).

Tempe merupakan bahan pangan penting di Indonesia. Berdasarkan survei yang dilakukan oleh Litbang Kompas (Satrio 2008) menunjukkan bahwa lebih dari 50% dari 808 responden dengan tingkat ekonomi beragam di pulau Jawa dan luar pulau Jawa mengaku mempunyai kebiasaan mengonsumsi tempe minimal seminggu tiga kali. Namun, dari berbagai alasan responden mengonsumsi tempe, hanya 21.2% menjawab karena cita rasa tempe enak, 34.4% menjawab karena bergizi dan baik untuk kesehatan, 21.7% menjawab karena harga murah, 16.2% menjawab karena kebiasaan, dan 6.5% menjawab karena alasan lain.

Cita rasa tempe sangat beragam antar pengrajin. Namun kadang-kadang tidak konsisten, dan bahkan pada jenis tempe tertentu dapat ditemukan cita rasa yang tidak disenangi oleh konsumen. Salah satu cita rasa yang tidak disenangi pada tempe ialah rasa pahit.

Intensitas rasa pahit dapat berbeda pada tempe yang diproduksi oleh pengrajin yang berbeda walaupun menggunakan jenis kedelai dan inokulum yang sama (Hartoyo 1994). Meskipun ada perbedaan relatif kesukaan terhadap rasa, tempe yang rasanya pahit merupakan sifat yang tidak disenangi oleh konsumen. Akibatnya konsumen menilai ada tempe enak dan ada tempe tidak enak.

Mikroorganisme sangat berperan dalam pembentukan cita rasa bahan pangan yang diproduksi melalui proses fermentasi (Hagedorn *et al.* 1994). Berikut ini adalah sejumlah contoh yang telah dilaporkan tentang peran mikroorganisme pada cita rasa atau kualitas bahan pangan. Rasa pahit pada keju disebabkan oleh aktivitas protease dari *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Broadbent *et al.* 2002). Keragaman bakteri asam laktat berpengaruh terhadap kualitas anggur (Rodas *et al.* 2003). Kualitas *nata de coco* dipengaruhi oleh interaksi *Acetobacter* dengan mikroorganisme lain selama fermentasi (Seumahu 2005). *Staphylococcus xylosus* berpengaruh pada pembentukan aroma sosis (Stahnke 1994). Jenis mikroorganisme yang berbeda memiliki fungsi yang berbeda beda dan sangat penting untuk menentukan kondisi lingkungan selama proses fermentasi tersebut berlangsung (Schwan 1998, Ampe *et al.* 2001, Randazzo *et al.* 2002). Keterlibatan mikroorganisme tertentu akan berpengaruh terhadap kualitas produksi.

Identifikasi keragaman mikroorganisme pada bahan makanan pada awalnya sangat sulit dilakukan karena sebagian besar mikroorganisme belum dapat dibiakkan pada media pada skala laboratorium (Giraffa & Neviani 2001). Alasan kegagalan kultivasi ini disebabkan antara lain oleh nutrisi dan kondisi pertumbuhan yang tidak sesuai, dan sifat kebergantungan dari banyak mikroorganisme lain (Pace, 1996; Felske *et al.* 1998). Bagian mikroorganisme yang belum dapat dikulturkan merupakan komponen utama dari komunitas mikroorganisme secara keseluruhan (Marchesi *et al.* 1998). Diperkirakan hanya sekitar 5% dari spesies mikroorganisme yang telah dapat dikulturkan (Hunter – Cevera 1998).

Sejalan dengan perkembangan ilmu dan teknologi, saat ini telah tersedia beberapa metode yang telah terbukti dapat digunakan untuk menganalisis komunitas mikroorganisme yang terdapat pada habitat tertentu. Saat ini telah berkembang teknik

aplikasi molekular untuk menganalisis keragaman mikroorganisme melalui analisis gen 16S rRNA. Salah satu diantaranya adalah metode *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) (Kent & Triplett 2002). Melalui metode T-RFLP akan diukur polimorfisme ukuran panjang fragmen produk PCR yang telah dipotong dengan enzim restriksi tertentu sehingga dapat diketahui minimal jenis bakteri yang terdapat dalam suatu ekosistem.

Sejauh ini faktor penyebab perbedaan cita rasa tempe belum pernah dilaporkan. Berdasarkan hasil survei yang kami lakukan ke sejumlah pengrajin di daerah Bogor (12 pengrajin), Jakarta (13 pengrajin), Solo (8 pengrajin), Medan (7 pengrajin), dan Jogyakarta (4 pengrajin), jenis inokulum yang digunakan para pengrajin sama. Namun para pengrajin memproduksi tempe melalui bermacam-macam metode pengolahan dan pada kondisi yang tidak terkontrol. Oleh sebab itu, selain *R. oligosporus*, berbagai jenis bakteri ditemukan selama proses pengolahan. Bahkan beberapa jenis bakteri diantaranya telah diketahui berperan dalam meningkatkan kualitas tempe, seperti *Citrobacter freundii* dan *Klebsiella pneumoniae* berperan meningkatkan kadar vitamin B₁₂ (Keuth & Bisping 1994), dan *Micrococcus* atau *Arthrobacter* berperan dalam pembentukan isoflavones (Klus *et al.* 1993). Namun, informasi tentang pengaruh komunitas bakteri terhadap cita rasa tempe belum pernah dilaporkan. Oleh sebab itu perlu diteliti guna meningkatkan kualitas cita rasa tempe.

Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengkaji bahwa bakteri berperan dalam pembentukan rasa pahit pada tempe. Untuk mencapai tujuan tersebut telah dilakukan serangkaian eksperimen untuk: (1) mendapatkan contoh tempe "pahit" dan "tidak pahit" melalui proses uji sensori terhadap beberapa jenis tempe, (2) mendapatkan pengaruh cara pengolahan yang berbeda terhadap rasa pahit pada tempe, (3) menganalisis pengaruh jenis kapang terhadap terbentuknya rasa pahit pada tempe, (4) menganalisis komunitas bakteri yang terdapat pada tempe "pahit" dan "tidak pahit" berdasarkan metode konvensional dan metode T-RFLP. Hasil penelitian ini diharapkan

bermanfaat untuk meningkatkan cita rasa tempe, dan sebagai dasar penelitian lebih lanjut tentang peranan bakteri dalam peningkatan kualitas tempe.

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

- . Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

TINJAUAN PUSTAKA

Keunggulan Tempe Sebagai Bahan Makanan

Tempe merupakan salah satu jenis bahan makanan tradisional khas Indonesia. Berdasarkan catatan sejarah, kata tempe berasal dari bahasa Jawa Kuno. Untuk pertama kali kata tempe ditemukan di dalam Serat Centhini, ditulis tahun 1660an, yang mengisahkan bahwa tempe telah digunakan sebagai salah satu komponen pada menu makanan kerajaan di Jawa Tengah (Astuti 1999a).

Tahun 1946 peneliti dari Belanda telah melakukan penelitian tentang manfaat tempe sehingga tempe mulai populer di Eropa. Di Amerika, tempe mulai dikenal sejak tahun 1946, dan tahun 1960-an ilmuwan dari Amerika banyak yang melakukan penelitian tentang tempe, diantaranya Steinkraus, Hesseltine, dan Wang sehingga mereka mengembangkan pabrik tempe secara komersial (Karyadi 1996).

Tempe merupakan bahan pangan yang memiliki banyak keunggulan. Kedelai sebagai bahan baku pembuatan tempe terdiri atas sekitar 40% protein, 20% lemak, 35% karbohidrat, dan sisanya 5% abu (Liu 1997). Pengolahan kedelai menjadi tempe telah merombak makromolekul kedelai menjadi molekul yang lebih sederhana sehingga mudah dicerna dan dimanfaatkan tubuh (Nout & Kiers 2005). Berbagai jenis vitamin B (B₁₂, riboflavin, piridoksin, niasin, biotin, folat) terdapat lebih tinggi pada tempe dibandingkan dengan kedelai. Tempe mengandung senyawa antibakteri yang telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, dan *Escherichia coli* 0125K70(B)H19 sehingga anak-anak yang mengalami diare akut akan lebih cepat sembuh bila mengkonsumsi makanan formula yang mengandung tempe (Karyadi & Hermana 1995). Menurut Murata (1985) FAO memilih tempe sebagai salah satu sumber protein nabati yang terbaik sebagai bahan pangan yang terbuat dari kedelai.

Senyawa antioksidan sangat penting untuk melindungi tubuh dari aktivitas radikal bebas yang menyebabkan berbagai jenis penyakit, seperti senyawa yang bersifat karsinogenik dan *aging* (Cutlar 1992). Pada tempe telah ditemukan

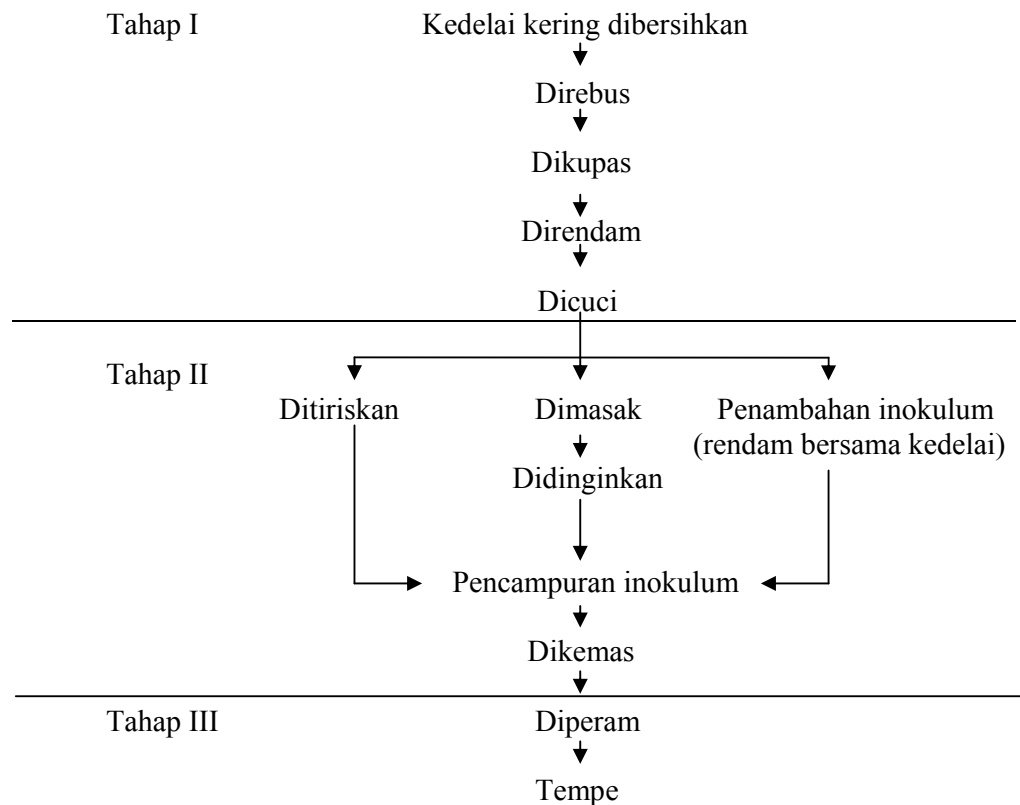
antioksidan 6,7,4-trihydroxyisoflavone (faktor 2) (Klus *et al.* 1993) dan 3-hydroxyanthranilic Acid (HAA) (Esaki *et al.* 1996).

Metabolisme kapang dan bakteri selama fermentasi meningkatkan kadar vitamin B, terutama riboflavin, niasin, vitamin B₆, dan B₁₂ (Denter *et al.* 1998). Beberapa galur *Rhizopus* dapat memproduksi betakaroten selama pengolahan tempe, sehingga tempe yang difermentasi dengan kultur tersebut dapat menjadi alternatif solusi bagi masyarakat yang mengalami kekurangan vitamin A (Denter *et al.* 1998). Selain itu, tempe terbukti dapat menanggulangi anemia karena mengandung zat besi (Astuti 1999b).

Proses Pembuatan Tempe

Teknologi pembuatan tempe seperti halnya teknologi pembuatan makanan tradisional lainnya, berkembang secara turun temurun dan berubah karena pengalaman. Teknologi pembuatan tempe sangat beragam, namun terdapat persamaan dalam beberapa hal antar pengrajin. Persamaan tersebut meliputi perebusan kedelai, pengupasan kulit kedelai, pengasaman kedelai, pencucian, pencampuran dengan inokulum, pengemasan, dan pemeraman. Namun, dalam perkembangan selanjutnya telah terjadi modifikasi karena pengalaman dan penyesuaian terhadap sarana atau sumber daya yang ada (Karyadi 1996).

Pembuatan tempe yang umum dipraktekkan di Indonesia saat ini terdiri atas tiga tahap (Gambar 1). Tahap I terdiri atas perebusan kedelai, pengupasan, perendaman, dan pencucian. Pada tahap I pada umumnya semua pengrajin menerapkan hal yang sama. Sebaliknya, tahap II antar pengrajin tidak sama. Beberapa pengrajin langsung meniriskan hasil tahap I lalu mencampur dengan inokulum, dikemas, dan selanjutnya masuk tahap III yaitu pemeraman. Beberapa pengrajin terlebih dahulu merebus kembali, didinginkan, ditambah inokulum, dikemas, lalu masuk tahap III, yaitu pemeraman. Ada juga pengrajin setelah tahap I langsung ditambah inokulum dengan merendamnya bersama-sama kedelai, ditiriskan, dikemas, lalu diperam (Hermana & Karmini 1996). Tahap utama pembuatan tempe ialah tahapan pemeraman (Kasmidjo 1995).



Gambar 1 Bagan alir teknologi pembuatan tempe (Hermana & Karmini 1996).

Selain tahapan proses produksi yang bervariasi dalam pembuatan tempe oleh pengrajin, terjadi juga modifikasi pada setiap tahap. Modifikasi tersebut antara lain waktu perendaman, waktu perebusan, jenis dan cara pemberian inokulum tempe, jenis bahan pengemas, cara membungkus, dan cara pemeram (Hermana & Karmini 1996).

Perebusan biji kedelai bertujuan untuk membunuh sebagian besar mikroorganisme, melunakkan biji kedelai agar dapat dengan mudah ditembus oleh miselia kapang, dan meningkatkan kandungan air biji kedelai sehingga kulit mudah dilepas. Perendaman bertujuan untuk pengasaman oleh bakteri asam laktat sehingga pH kurang dari 5. Pencucian kedelai bertujuan untuk membuang kulit, menghilangkan lendir dan mengurangi keasaman yang terbentuk selama perendaman kedelai. Pengemasan bertujuan untuk membatasi oksigen dan mengoptimalkan suhu agar sesuai bagi pertumbuhan kapang. Pemeraman yang

baik berada pada suhu sekitar 20-37⁰C karena pada kisaran suhu tersebut kapang dapat tumbuh dengan baik (Karyadi 1996).

Mikroorganisme pada Tempe

Mikroorganisme yang berperan selama proses pengolahan tempe sangat kompleks dan berkembang sejak awal perendaman kedelai (Nout & Klers 2005). Keberadaan mikroorganisme tersebut dapat dilihat dari terjadinya pengasaman secara alami selama perendaman, kontaminasi selama pengemasan, dan inkubasi serta komposisi inokulum yang berbeda-beda. Mikroorganisme yang penting pada pengolahan tempe adalah kapang dan bakteri. Miselium kapang penting untuk mengikat kotiledon kedelai sehingga menjadi satu kesatuan yang berbentuk dan bakteri berperan selama pengasaman kedelai.

Kelompok kapang yang paling berperan adalah genus *Rhizopus*. Genus ini termasuk famili Mucoraceae, ordo Mucorales, subkelas Zygomycotina, dan kelas Zygomycetes. Genus ini terdiri atas beberapa spesies (Hesseltine 1985). Spesies yang paling penting adalah *R. oligosporus*, *R. arrhizus*, *R. stolonifer*, *R. oryzae*, *Mucor* sp., dan *Aspergillus* sp. (Pawiroharsono 1994).

Selama proses pengolahan tempe *Rhizopus* berperan meningkatkan kelarutan protein, lemak dan karbohidrat (Jutono 1985), namun masing-masing spesies memiliki kemampuan yang berbeda-beda. Konsentrasi asam amino bebas tertinggi diperoleh pada tempe yang menggunakan *R. oligosporus* dibandingkan dengan *R. stolonifer* dan *R. oryzae* (Keuth & Bisping 1994).

Rhizopus diformulasikan dalam bentuk ragi, usar, inokulum, atau starter (selanjutnya disebut inokulum). Inokulum diolah dengan menumbuhkan kapang pada media tertentu. Pada awalnya digunakan daun *Hibiscus similis*, *H. tiliaceus*, *Tectona grandis* atau *Bambusa* sp. (Jutono 1985), namun lebih lanjut digunakan nasi, kedelai, atau onggok. Selanjutnya, inokulum tersebut digunakan sebagai sumber inokulum pada pembuatan tempe (Pawiroharsono 1994). Saat ini inokulum tempe yang digunakan oleh para pengrajin tempe di Indosnesia pada umumnya berasal dari jenis inokulum yang sama, yaitu inokulum dengan merek dagang Raprima yang diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi, Bandung.

Peran bakteri selama pengolahan tempe di Indonesia sangat penting untuk mengasamkan kedelai, namun peran bakteri ini lebih lanjut belum teridentifikasi dengan baik. Di negara beriklim subtropis pengasaman alami selama perendaman tidak selalu terjadi atau sangat lambat (Liu 1997). Pada suhu yang sangat dingin fermentasi asam laktat pada umumnya tidak berlangsung dengan baik, sehingga untuk mencapai pH yang diinginkan dilakukan perendaman dalam asam laktat 0.85% selama 2 jam pada suhu 25 °C atau 20 menit pada suhu 100 °C. Namun menurut Nout dan Kiers (2005) cukup dengan asam laktat $\leq 0.5\%$ atau asam asetat $\leq 0.25\%$.

Bakteri asam laktat (BAL) memberikan kontribusi penting dalam proses pengolahan tempe karena menjamin keamanan untuk mengkonsumsi tempe yang dihasilkan. Hal ini karena selama fermentasi berlangsung terbentuk asam-asam organik yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dan mikroorganisme pembusuk pada tempe. Jenis mikroorganisme yang umum ditemukan adalah kelompok Enterobacillus seperti *Lactobacillus* sp., dan *L. plantarum* (Pawiroharsono 1994).

BAL yang terdapat selama perendaman secara signifikan meningkatkan asam-asam organik (Nout & Kiers 2005). Asam organik utama yang terdapat pada perendaman kedelai adalah asam laktat (Sparringa & Owens 1999; Nout & Kiers 2005).

Mikroorganisme utama untuk pembuatan tempe adalah golongan *Rhizopus*. Namun selain itu, tempe segar mengandung bakteri mesofilik aerob, seperti Enterobacteria, Stafilokokus dan khamir. Keberadaan bakteri umumnya tidak menghambat proses fermentasi (Ko 1985). Pada tempe Indonesia terdapat bakteri asam laktat sekitar 10^9 - 10^{10} CFUg⁻¹, Enterobacteriaceae 10^8 - 10^9 CFUg⁻¹, bakteri berspora 10 - 10^2 CFUg⁻¹, dan bakteri mesofilik (kecuali BAL) 10^8 - 10^9 CFUg⁻¹ (Han *et al.* 1999).

Peran Bakteri dalam Cita Rasa Bahan Pangan Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses yang sudah lama digunakan untuk memproduksi bahan pangan. Pada proses fermentasi kultur starter, bahan baku, dan teknologi yang digunakan menentukan cita rasa yang terbentuk.



Pada proses fermentasi selain tempe telah banyak diteliti peran mikroorganisme terhadap produk yang dihasilkan. Banyak jenis mikroorganisme yang berperan dalam pembentukan cita rasa. Bagaimana pengaruh bakteri terhadap flavor dan tekstur tempe belum pernah diteliti (Ko 1985).

Pembentukan flavor bahan pangan hasil fermentasi sangat tergantung pada jenis mikroorganisme yang terdapat selama proses berlangsung. Penelitian tentang keragaman mikroorganisme pada proses fermentasi bahan pangan perlu dilakukan agar memudahkan pembuatan kultur starter yang digunakan (Schwan 1998), karena komunitas mikroorganisme menentukan kualitas dan konsistensi produk yang dihasilkan.

Pada proses fermentasi *nata de coco*, mikroorganisme yang paling berperan adalah *Acetobacter*. Namun, penggunaan kultur starter tunggal *Acetobacter* saja akan menghasilkan kualitas *nata de coco* yang lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan kultur starter campuran *Acetobacter* dengan jenis bakteri lain. Keberadaan jenis bakteri lain dapat meningkatkan kualitas *nata de coco*. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya simbiosis antara *Acetobacter* dengan jenis bakteri lain selama proses fermentasi *nata de coco* berlangsung. Diduga keberadaan jenis bakteri lain tersebut memberi kontribusi terhadap peningkatan jumlah sel *Acetobacter* pada proses fermentasi *nata de coco* (Seumahu 2005).

Analisis komunitas bakteri dengan metode molekular pada dua jenis proses pengolahan/fermentasi vanila menunjukkan bahwa proporsi bakteri yang bersifat tidak dapat dikulturkan (*unculturable*) sangat tinggi. Hasil analisis komunitas bakteri menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah, komposisi, dan kemampuan proteolitik bakteri yang sangat tinggi. Besarnya perbedaan tersebut menunjukkan besarnya perbedaan aktivitas bakteri selama proses pembentukan flavor dan menyebabkan terjadinya perbedaan flavor vanila yang dihasilkan (Roling *et al.* 2003).

Rasa pahit yang melebihi ambang batas penerimaan konsumen ditemukan pada keju. Rasa pahit tersebut disebabkan karena adanya akumulasi molekul peptida yang terbentuk selama proses fermentasi susu menjadi keju berlangsung.

Akumulasi molekul peptida tersebut terjadi karena aktivitas protease ekstraseluler dari *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Broadbent *et al.* 2002).

Soy daddawa merupakan suatu jenis makanan tradisional Nigeria yang diolah melalui proses fermentasi kedelai. *Soy daddawa* yang diproduksi dengan menggunakan kultur starter berbagai jenis *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*) menghasilkan cita rasa yang berbeda. Cita rasa *soy daddawa* yang diproduksi dengan kultur starter *B. subtilis* berbeda secara signifikan dibandingkan dengan *soy daddawa* yang diproduksi dengan kultur starter jenis *Bacillus* lainnya. Perbedaan cita rasa tersebut terjadi karena *B. subtilis* mempunyai kemampuan yang lebih tinggi menghasilkan enzim protease dibandingkan dengan jenis lainnya (Omafuvbe *et al.* 2002).

Aktivitas enzim proteolitik dari *Bacillus subtilis* dapat meningkatkan intensitas rasa pahit pada produk hidrolisat protein kedelai karena terbentuknya molekul peptida. Rasa pahit dapat juga karena terbebasnya asam amino leusin, dimana asam amino tersebut bersifat pahit (Marshall 1990).

Kedelai sebagai bahan baku pembuatan tempe, mengandung protein sekitar 40% dari total berat kering kedelai (Liu 1997). Hidrolisis enzimatis protein pada bahan makanan menghasilkan produk hidrolisat yang menyebabkan rasa pahit karena terbentuknya molekul peptida yang bersifat hidrofobik (Reineccius 1994). Molekul peptida yang memiliki berat molekul antara 2400 -3500 Da hasil hidrolisis 11S glisin memberikan rasa pahit (Kim *et al.* 2003).

Tidak semua jenis mikroorganisme yang menghasilkan enzim proteolitik meningkatkan rasa pahit pada produk hidrolisat protein. Menurut Marshall (1990) *Micrococcus* merupakan bakteri yang bersifat proteolitik, namun bakteri tersebut dapat mengurangi rasa pahit dari produk hidrolisat protein kedelai karena mampu mengkonversi asam amino yang pahit, khususnya leusin menjadi aldehyd-aldehyd alifatik seperti isopentanal. Akumulasi dari aldehyd alifatik seperti isopentanal tersebut mengakibatkan terbentuknya suatu profil cita rasa yang kompleks yang menyerupai rasa kaldu. Konversi tersebut diduga melalui suatu proses deaminasi oksidatif yang selanjutnya diikuti dengan dekarboksilasi menjadi isopentanal.

Analisis Komunitas Bakteri dengan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms*

Menganalisis keragaman mikroorganisme yang terdapat pada lingkungan khususnya yang terdapat pada bahan makanan pada awalnya sangat sulit dilakukan karena sebagian besar dari mikroorganisme tersebut belum dapat dikulturkan pada media untuk skala laboratorium (Giraffa & Neviani 2001). Hanya sekitar 5% dari spesies mikroorganisme yang telah dapat dibiakkan di laboratorium (Hunter-Cevera 1998). Namun sekarang pendekatan yang dilakukan untuk identifikasi dan klasifikasi mikroorganisme banyak menggunakan metode molekular. Pendekatan molekular yang banyak dilakukan antara lain melalui pendekatan analisis sekuen 16S rRNA atau 23S rRNA.

RNA ribosom (rRNA) merupakan bagian dari ribosom (ribosom terdiri atas rRNA dan protein) yang memiliki peranan besar selama proses translasi atau biosintesis protein. Semua rRNA pada makhluk hidup identik secara fungsional yaitu berperan dalam proses translasi atau biosintesis protein (Gutell *et al.* 1994).

Pada prokariot, dan juga kloroplas dan mitokondria eukariot, terdapat tiga macam rRNA, yaitu 5S rRNA, 16S rRNA, dan 23S rRNA. Panjang gen 16S rRNA dan 23S rRNA mengandung kira-kira 1500 dan 3000 nukleotida. Gen 16S rRNA mempunyai beberapa daerah dengan sekuen yang konservatif dan juga daerah yang sekuen-sekuennya sangat bervariasi. Perbandingan sekuen yang konservatif pada molekul rRNA 16S sangat berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena untuk keperluan tersebut dibutuhkan molekul yang berubahnya relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, sekuen pada rRNA 16S yang bersifat hipervariabel banyak digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies (Suwanto 1994).

Sudah banyak laporan tentang primer umum yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA bakteri, akan tetapi sering ada masalah karena primer umum tersebut dibuat menggunakan database sekuen 16S rRNA yang tidak lengkap dari organisme yang telah dapat dikulturkan. Oleh sebab itu, Marchesi *et al.* (1998) telah mendesain dan mengevaluasi primer 63f dan 1387r

yang mampu mengamplifikasi gen 16S rRNA dari bakteri berukuran sekitar 1300 pasang basa.

Beberapa teknik yang digunakan untuk menganalisis komunitas mikroorganisme yang berdasarkan 16S rRNA antara lain dengan teknik *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA), T-RFLP, dan *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE). T-RFLP merupakan salah satu pendekatan molekular terkini yang dapat menduga adanya perbedaan genetik antar galur. Teknik T-RFLP dalam membedakan genetik mikroorganisme yaitu dengan mengukur polimorfisme dari panjang potongan terminal produk PCR. Menurut Marsh (1999), teknik T-RFLP merupakan gabungan dari teknik RFLP, PCR, dan elektroforesis. Teknik T-RFLP dapat digunakan untuk mendiskriminasi komunitas mikroorganisme pada habitat berbeda.

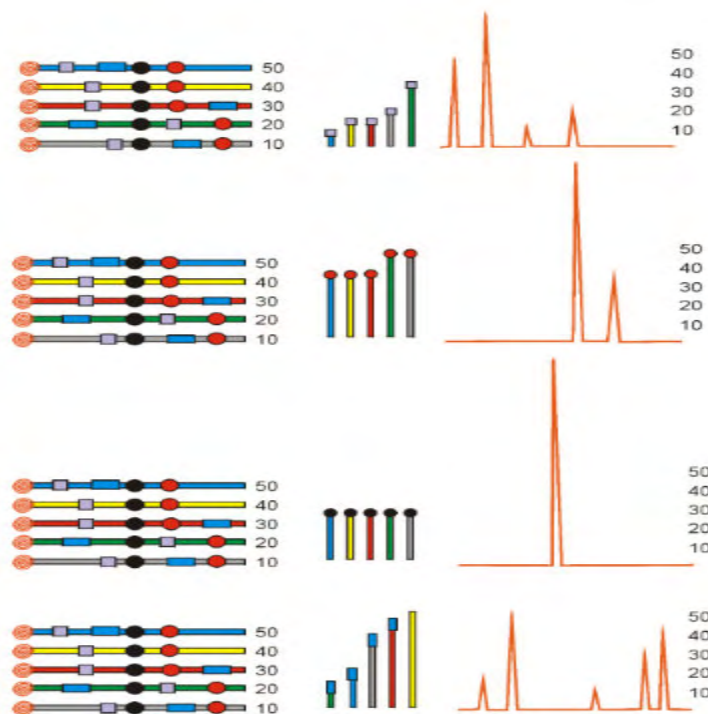
Teknik T-RFLP telah digunakan oleh beberapa peneliti untuk menganalisis mikroorganisme pada suatu habitat. Cansilla *et al.* (1992), menggunakan teknik T-RFLP untuk menghasilkan sidik jari galur-galur *Lactococcus lactis* yang sekerabat. Aghajani *et al.* (1996), menggunakan T-RFLP untuk menganalisis galur *Mycobacterium*. Liu *et al.* (1997) menggunakan teknik T-RFLP dalam menganalisis mikroorganisme dari beberapa habitat, yaitu lumpur bioreaktif, lumpur teraktifkan, dan usus rayap. Lukow *et al.* (2000), menggunakan teknik T-RFLP untuk membandingkan komunitas mikroorganisme antara tanah yang ditanami tanaman transgenik dan non tanaman transgenik.

T-RFLP merupakan metode yang sangat cepat dan akurat dalam menganalisis dan membandingkan keragaman bakteri yang kompleks. Untuk membandingkan komunitas mikroorganisme pada habitat yang berbeda analisis T-RFLP jauh lebih mudah dibandingkan dengan RFLP (ARDRA) (Liu *et al.* 1997).

Langkah awal teknik T-RFLP adalah isolasi DNA, selanjutnya amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR yang menggunakan primer yang pada terminal 5' dilabel dengan senyawa yang berfluoresens agar dapat dideteksi oleh piranti *automated DNA sequenser*. Selanjutnya, dilakukan proses pemurnian produk PCR, dan pemotongan dengan enzim restriksi yang memotong sering yang mengenali empat basa DNA. Produk PCR yang telah dipotong dengan enzim

tertentu tersebut dilarikan pada mesin *automated DNA sekuenser* dengan menggunakan program GeneScan[®]. Sebelum produk PCR dilarikan pada *automated DNA sekuenser*, terlebih dahulu dilakukan pencampuran dengan *loading dye* dan standar internal ukuran (*DNA internal marker*), kemudian didenaturasi pada 95 °C selama 5 menit sehingga hanya potongan yang mengandung senyawa berfluorosens saja yang dideteksi oleh mesin *automated DNA sekuenser* tersebut (Yogiara 2004).

Prinsip kerja T-RFLP diilustrasikan pada Gambar 2 di bawah ini. Balok panjang berwarna-warni menggambarkan DNA produk PCR. Lingkaran yang berspiral yang berwarna merah di sebelah kiri menunjukkan label senyawa berfluorosens. Bentuk bujur sangkar abu-abu, persegi panjang biru, bulat hitam, dan merah menunjukkan situs pemotongan enzim restriksi pada setiap sekuen DNA hasil PCR. Grafik menunjukkan keberadaan dan kelimpahan setiap fragmen DNA. Angka menunjukkan kelimpahan relatif dari produk sekuen DNA produk PCR (<http://www.bibliographics.com/LAB/T-RFLP.htm>).



Gambar 2 Ilustrasi prinsip kerja analisis komunitas mikroorganisme menggunakan analisis *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (<http://www.bibliographics.com/LAB/T-RFLP.htm>).

Menurut Tiedje *et al.* (1999), enzim restriksi yang dapat menghasilkan keragaman ukuran potongan ujung paling baik untuk komunitas bakteri adalah *HhaI* (*isoschizomer* dengan *HinP1*), *RsaI* dan *MspI*. Selanjutnya, Engebretson dan Moyer (2003) merekomendasikan penggunaan kombinasi enzim restriksi *BstUI*, *DdeI* dan *MspI*.

Pada saat enzim restriksi bujur sangkar abu-abu digunakan, maka ukuran panjang yang akan dideteksi dimulai dari ujung 5' terlabel sampai titik situs pemotongan enzim restriksi tersebut. Ukuran panjang produk PCR hasil pemotongan dengan enzim tersebut (selanjutnya disebut TRF) dideteksi dan ditampilkan dalam bentuk puncak-puncak grafik. Ukuran panjang TRF tersebut ditentukan berdasarkan posisi potongan terhadap *DNA internal marker*. Untuk enzim bujur sangkar abu-abu terdapat empat puncak TRF yang muncul karena 2 TRF mempunyai ukuran yang sama panjang yaitu balok kuning dan balok merah. Tinggi rendahnya puncak grafik tergantung dari intensitas pendaran senyawa yang berfluorosens yang berhubungan dengan jumlah TRF tersebut. Produk PCR biru berjumlah 50, maka tinggi puncak TRF balok biru setara dengan intensitas pendaran 50 produk PCR. Produk PCR kuning dan merah memiliki ukuran TRF yang sama, maka intensitas pendaran akan setara dengan gabungan kedua TRF tersebut, yaitu setara dengan 70. Berdasarkan penjelasan tersebut di atas maka, satu ukuran TRF bisa jadi terdiri dari banyak TRF yang berbeda yang memiliki ukuran panjang yang sama saat didigesti dengan enzim tertentu (Yogiara, 2004).

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium *Research Center for Microbial Diversity* (RCMD) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Organoleptik Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, dan Laboratorium Teknologi DNA Fakultas Teknobiologi Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya Jakarta. Waktu penelitian mulai Oktober 2005 sampai dengan Desember 2007.

Bahan dan Alat

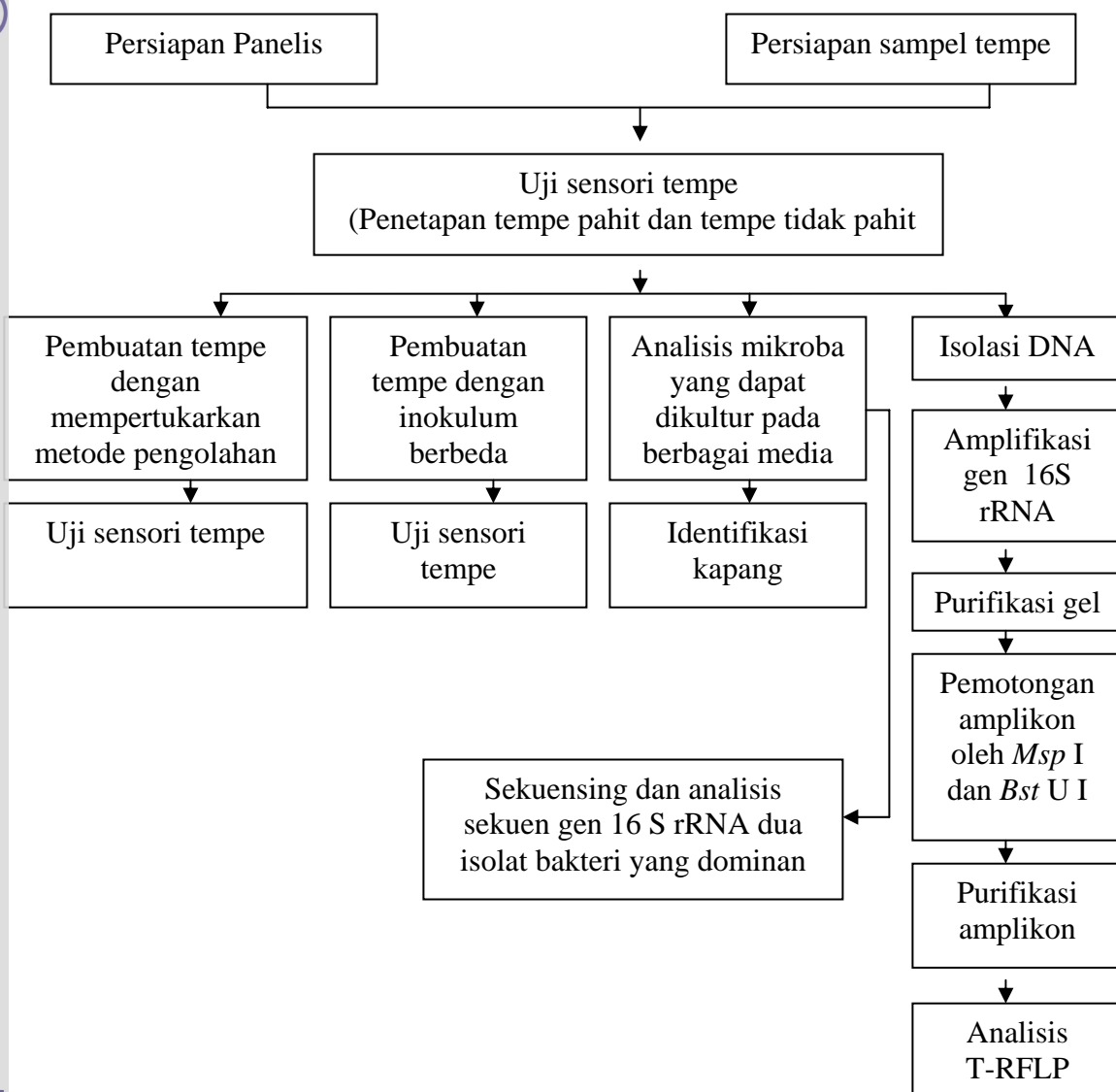
Pada uji sensori digunakan sukrosa, kafein, NaCl, MSG dan asam sitrat. Enzim yang digunakan *Bst*UI, *Msp*I, dan Taq polimerase dari New England Biolabs (NEB) USA. Primer yang digunakan yaitu primer 27f FAM (5'- AGAGTTTGATCC TGGCTCAG -3'), 63f (5'- CAGGCCTAACACATGCAAGTC -3'), dan 1387r (5'- GGGCGGWGTGTACAAGGC -3'). Primer 27f FAM terlebih dahulu dilabel dengan *phosphoramidite fluorochrome 5-carboxyfluorescens*. Bahan untuk isolasi DNA genom digunakan *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) dan untuk purifikasi DNA digunakan Wizard[®] SV Gel and Clean-Up System, Promega, USA.

Untuk menumbuhkan berbagai jenis mikroba yang terdapat pada sampel digunakan *Plate Count Agar/PCA* (Oxoid), *Eosin Methylene Blue Agar/EMB* (Difco), dan *Potato Dextrose Agar/PDA* (Difco). PDA ditambah 0.3g/l ampicilin dan 0.3 g/l streptomycin.

Alat-alat utama yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat piranti elektroforesis mini gel (Bio-Rad Mini-Sub Cell GT. CA.USA), UV *Transilluminator* (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA), *Microcentrifuge* (SORVALL[®] Pico, USA), mesin PCR (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer, Norwalk), mesin *automatic DNA sekuenser* ABI PRISM 2400 (Perkin Elmer, USA).

Metodologi

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahap. Tahapan kerja penelitian disajikan pada Gambar 3 di bawah ini.



Gambar 3 Tahapan kerja penelitian.

Pengadaan Sampel Tempe

Sampel tempe diperoleh dari lima pengrajin yang berada di wilayah Kota Bogor, yaitu tempe CLR, DRG, MLB, EMP, dan WJB. Penamaan tempe EMP, DRG, MLB, CLR, dan WJB dibuat berdasarkan singkatan nama lokasi pengrajin tempe berada. Kelima jenis tempe diproduksi oleh masing-masing pengrajin dengan menggunakan jenis kedelai yang sama. Tempe CLR, DRG, MLB, EMP diolah dengan metode atau tahapan pengolahan yang sama (pengrajin menyebutnya pengolahan tempe Pekalongan), sedangkan pengolahan tempe WJB berbeda dari yang lainnya (pengrajin menyebutnya pengolahan tempe Malang).

Uji Sensori Rasa Pahit Tempe

Untuk membedakan intensitas rasa pahit kelima jenis sampel tempe (CLR, DRG, MLB, EMP, dan WJB) dilakukan uji sensori. Uji sensori terhadap intensitas rasa pahit tempe ini mengikuti metode Myong *et al.* (2004) dengan modifikasi.

Persiapan Sampel Tempe

Tempe segar berukuran 12 cm x 2 cm x 2 cm dikukus selama 15 menit. Selanjutnya tempe tersebut disajikan kepada panelis dengan ukuran 4 cm x 2 cm x 2 cm.

Persiapan Panelis

Uji sensori dilakukan oleh panelis terlatih. Persiapan panelis dilakukan melalui tahapan seleksi panelis dan pelatihan panelis.

a. Seleksi Panelis

Sebanyak 60 orang calon panelis diperoleh dari mahasiswa Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan IPB. Seleksi dilakukan dalam tiga tahap. Tahap pertama ialah *Matching test* lima rasa dasar: asam, manis, pahit, asin, dan gurih. Untuk rasa asam digunakan asam sitrat 0.04%, rasa manis digunakan sukrosa 0.7%, rasa pahit digunakan kafein 0.04%, rasa asin digunakan NaCl 0.2%, dan rasa gurih digunakan

MSG 1%. Bagi panelis yang menjawab 80% benar melanjutkan ke seleksi tahap kedua. Tahap kedua ialah uji segitiga rasa pahit. Konsentrasi kafein yang digunakan adalah 0.02% dan 0.04%. Calon panelis yang menjawab 80% benar akan mengikuti seleksi tahap ketiga, yaitu uji ranking rasa pahit. Pada uji ranking rasa pahit ini digunakan kafein 0.025, 0.04%, 0.06%, dan 0.08%. Dari 60 orang calon panelis diperoleh 13 (tiga belas) orang sebagai panelis terpilih.

b. **Pelatihan Panelis**

Ketiga belas panelis terpilih selanjutnya dilatih dengan uji segitiga rasa pahit dan uji ranking rasa pahit. Uji ranking rasa pahit dilakukan dengan tiga jenis konsentrasi larutan kafein, yaitu 0.025%, 0.05%, dan 0.06%. Uji ranking rasa pahit dilakukan sampai panelis dengan pasti dapat mengingat intensitas rasa pahit masing-masing konsentrasi. Untuk memastikan panelis terpilih pasti mengingat intensitas rasa pahit tersebut yaitu dengan melihat jawaban 100% benar. Pada saat pelatihan, panelis dilatih juga mengenal rasa beberapa jenis tempe sebelum melakukan pengujian sampel tempe yang sesungguhnya.

Pengujian Intensitas Rasa Pahit Tempe

Di hadapan panelis disajikan sampel tempe dan standar. Panelis diminta membandingkan intensitas rasa pahit antara sampel tempe dengan standar. Selanjutnya, panelis diminta menilai intensitas rasa pahit sampel tempe tersebut dan menuliskan hasilnya pada lembar uji yang telah disiapkan (Lampiran 9). Standar rasa pahit yang digunakan adalah kafein dengan konsentrasi 0.025% dan 0.05%.

Pengolahan Data

Data hasil pengujian intensitas rasa pahit tempe dianalisis dengan Analisis Sidik Ragam. Apabila pada hasil Analisis Sidik Ragam terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji *Honestly Significant Difference* (HSD) (Gomez & Gomez 1995). Dari pengolahan data tentang intensitas rasa pahit tempe yang diperoleh berdasarkan uji sensori maka akan diperoleh jenis tempe "tidak pahit"

(intensitas rasa pahit paling rendah), dan tempe "pahit" (intensitas rasa pahit tertinggi).

Pengolahan Tempe

Pembuatan tempe dilakukan dua kali, yaitu: 1) pembuatan tempe dengan metode yang dilakukan oleh pengrajin tempe rasa "tidak pahit" dan pengrajin tempe rasa "pahit", 2) pembuatan tempe menggunakan inokulum dari kedua pengrajin (inokulum bermerek Raprima saja dan campuran inokulum bermerek Raprima dengan onggok). Pembuatan tempe dengan cara pengolahan tempe WJB (Gambar 5). Masing-masing tempe yang diproduksi selanjutnya diuji sensori rasa pahitnya.

Analisis Kapang

Analisis kapang dilakukan terhadap tempe segar rasa "tidak pahit" dan tempe segar rasa "pahit". Medium yang digunakan ialah *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Difco) yang ditambah ampicilin 0.3 g l^{-1} , streptomycin 0.3 g l^{-1} , dan 16 ml/l (v/v) asam tartarat 10% sehingga diperoleh pH medium 4.

Sebanyak 25 g masing-masing sampel tempe segar dimasukkan ke dalam 225 ml NaCl 0.85%, dilumatkan, dan dibuat seri pengenceran hingga 10^5 . Sebanyak 100 μl suspensi dari setiap seri pengenceran ditumbuhkan pada medium PDA dengan metode tuang. Masing-masing diulang dua kali. Koloni kapang yang tumbuh yang berumur tiga hari diamati morfologinya di bawah mikroskop untuk menentukan jenisnya. Identifikasi dilakukan mengikuti Rifai (1973) dan Domsch *et al.* (1980).

Analisis Bakteri Secara Konvensional

Analisis bakteri dilakukan terhadap kedua jenis sampel tempe (tempe "tidak pahit" dan tempe segar "pahit"). Analisis dilakukan masing-masing terhadap tempe segar dan air rendamannya. Air rendaman diambil tiga tahap, yaitu 1, 7, dan 14 jam setelah kedelai direndam. Semua proses analisis komunitas bakteri dilakukan dalam keadaan steril.

Dua puluh lima gram tempe segar dimasukkan ke dalam 225 ml NaCl 0.85%, lalu dilumatkan dengan stomacher selama 1.5 menit. Sebanyak 25 ml air rendaman

kedelai diencerkan dengan 225 ml NaCl 0.85%. Masing-masing sampel dibuat seri pengenceran hingga 10^8 . Sebanyak 100 μ l suspensi dari setiap seri pengenceran disebar untuk memperoleh total sel bakteri mesofil aerob pada media *Plate Count Agar/PCA* (Oxoid), total sel bakteri *Enterobacteria* pada media *Eosin Methylene Blue Agar /EMB* (Difco), dan bakteri berspora (dipanaskan 15 menit pada suhu 85°C) pada media PCA. Masing-masing uji dilakukan dua ulangan. Koloni yang tumbuh dihitung jumlahnya dan diamati perbedaan jenisnya berdasarkan pada ciri morfologi.

Uji positif penghasil enzim protease dilakukan terhadap bakteri yang tumbuh pada media PCA dan bakteri penghasil spora. Pengujian menggunakan media PCA yang ditambah susu skim 2%. Bakteri uji ditotolkan pada media PCA dan diinkubasi pada suhu ruang selama semalam. Uji positif bakteri penghasil enzim protease ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni bakteri.

Identifikasi Bakteri yang dapat Dikulturkan Berdasarkan Sekuen Gen 16S

rRNA

Dua jenis koloni bakteri yang dominan pada media PCA masing-masing diidentifikasi berdasarkan sekuen gen 16S rRNA-nya. Sebanyak 1.5 ml suspensi bakteri yang tumbuh pada media PCA cair selama satu malam disentrifugasi selama tiga menit pada kecepatan 10.000 rpm. Pelet ditambah 200 μ l NaCl 0.85%, dan selanjutnya DNA genomnya diekstraksi sesuai prosedur *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Gen 16S rRNA diamplifikasi dengan mesin PCR (Gene Amplification system 2400, Perkin Elmer) menggunakan primer 63f (5'- CAGGCCTAACACATGCAA GTC) dan 1387r (5'- GGGCGGWGTGTACAAGGC -3') (Marchesi *et al.* 1998). Kondisi reaksi adalah sebagai berikut: 36 μ l ddH₂O, 5 μ l 10 x bufer polimerase, 1 μ l dNTPs, 1 μ l DNA polimerase, masing-masing 2 μ l primer (5 pmol/ μ l), dan 3 μ l DNA sampel. Campuran tersebut diinkubasi pada mesin PCR (Perkin Elmer, GeneAmp system 2400). Protokol PCR sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 92°C selama 30 detik, *annealing* primer pada suhu 62°C selama 30 detik, *elongasi* atau pemanjangan pada suhu 72°C

selama 30 detik, dan *post* PCR pada suhu 72 °C selama 7 menit. Hasil PCR diamati pada elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 0.8%. Amplifikasi dengan mesin PCR ini dilakukan 25 siklus. Pita DNA yang berukuran sekitar 1.300 bp dipotong dan dipurifikasi menggunakan Wizard® SV Gel and Clean-Up System (Promega). DNA hasil purifikasi ditambah *nuclease free-water* 35 µl. Sekuensing DNA dilakukan pada piranti *automatic* DNA sekuenser ABI PRISM 2400 (Perkin Elmer, USA). Sekuen yang diperoleh disejajarkan dengan sekuen DNA yang ada di basis data *European Bioinformatics Institute* (EBI) menggunakan program BLASTX 2.0.

Isolasi DNA Genom Langsung dari Sampel

Sebanyak 10 gram tempe segar dimasukkan ke dalam 90 ml 0.85% NaCl, dan dihancurkan. Selanjutnya, sebanyak 2.0 ml suspensi diambil dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet diresuspensi dengan menambahkan 1ml 0.85% NaCl dan disentrifugasi kembali. Pelet yang terbentuk diresuspensi kembali dengan menambahkan 0.5 ml 0.85% NaCl. Selanjutnya, pengekstraksian DNA dilakukan mengikuti prosedur pada *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Sebanyak 2.0 ml air disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Pelet diresuspensi dengan menambahkan 1 ml 0.85% NaCl dan disentrifugasi kembali. Pelet yang terbentuk diresuspensi kembali dengan menambahkan 0.5 ml 0.85% NaCl. Selanjutnya, pengekstraksian DNA dilakukan mengikuti prosedur pada *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA bakteri secara langsung dari air rendaman kedelai dan dari tempe segar digunakan primer 27f FAM (5'- AGAGTT TGATCCTGGCTCAG -3') dan 1387r (5'- GGGCGGWGTGTACAAGGC -3'). Kondisi reaksi adalah sebagai berikut: 36 µl ddH₂O, 5 µl 10 x bufer polimerase, 1 µl dNTPs, 1 µl DNA polimerase, masing-masing 2 µl primer (5 pmol/µl), dan 3 µl

DNA sampel. Campuran tersebut diinkubasi pada mesin PCR (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer, USA). Protokol PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi 92 °C selama 30 detik, *annealing* primer 62 °C selama 30 detik, *elongasi* atau pemanjangan 72 °C selama 30 detik, *post PCR* 72 °C selama 7 menit, dan suhu penyimpanan 4 °C. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR ini dilakukan sebanyak 30 siklus. Hasil PCR kemudian diamati dengan elektroforesis gel agarose 0.8%. Pita DNA yang berukuran sekitar 1300 bp dipotong untuk selanjutnya dipurifikasi menggunakan Wizard® SV Gel and Clean-Up System. DNA yang diperoleh dari hasil purifikasi ini ditambah *nuclease free-water* 35 µl.

Pemotongan Amplikon dengan Enzim Restriksi

Amplikon hasil PCR yang telah dipurifikasi dari gel selanjutnya dipotong dengan menggunakan Enzim restriksi *Bst*UI dan *Msp*I yang memotong sering, yang mengenali situs 4 basa (New England Biolab, Beverly, MA). Kondisi reaksi dari masing-masing jenis enzim adalah 1.0 µl enzim, 1.0 µl 10X bufer restriksi, dan 8 µl DNA. Pemotongan oleh enzim *Bst*UI diinkubasi pada suhu 60 °C selama ± 16 jam, dan pemotongan oleh *Msp*I diinkubasi pada 37 °C selama ± 16 jam. Hasil pemotongan selanjutnya dipurifikasi dengan metode *Ethanol Precipitation* (Sambrook dan Russell, 2001). DNA hasil purifikasi ditambah *nuclease free- water* 5 µl.

Analisis T-RFLP

Kondisi reaksi yang digunakan untuk mengetahui panjang potongan terminal produk PCR yang terlabel bahan fluorescens adalah sebagai berikut: sampel (DNA) hasil pemotongan dengan enzim restriksi yang telah dipurifikasi ditambah Hi Di™ 11.85 µl, dan standar internal (GeneScan™-500 LIZ®) 0.15 µl. Campuran tersebut didenaturasi pada mesin PCR (geneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Norwalk) pada suhu 95 °C selama 3 menit. Setelah denaturasi, dengan cepat didinginkan pada es. Selanjutnya, campuran ini dilarikan pada mesin sekuenser ABI Prism™ 310 *Genetic Analyzer* (AB Applied Biosystem, Foster City, California). Kondisi alat

adalah sebagai berikut: waktu injeksi 5 detik, beda potensial pada saat injeksi 15 KV, beda potensial pada saat *run* 15 KV, suhu 60 °C, waktu 30 menit, kekuatan laser 9.9 Mwatt. Panjang potongan terminal produk PCR yang terlabel bahan fluorescens dideterminasi menggunakan program GeneScan (Blackwood *et al.* 2003).

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

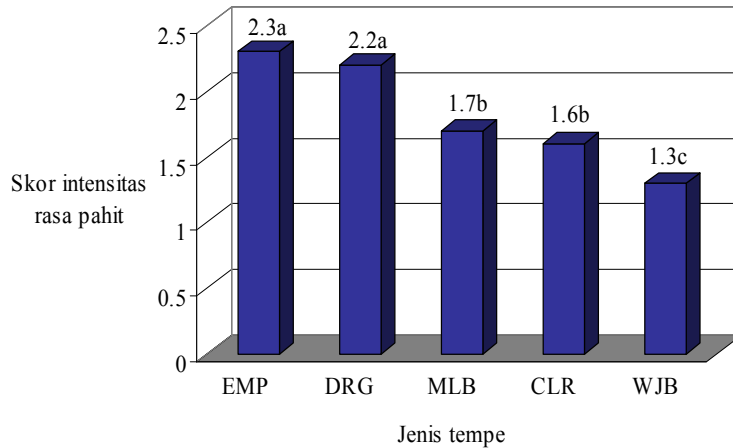
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Sensori Rasa Pahit Tempe

Uji sensori rasa pahit dilakukan terhadap lima jenis tempe (EMP, DRG, MLB, CLR, dan WJB) yang berasal dari lima pengrajin dengan lokasi yang berbeda, yang diproduksi dengan bahan baku kedelai yang sama. Uji sensori dilakukan bertujuan untuk mendapatkan dua jenis contoh tempe yang memiliki rasa paling berbeda yaitu: tempe rasa “paling pahit” dan tempe “tidak pahit” yang akan diteliti lebih lanjut.



Gambar 4 Skor intensitas rasa pahit beberapa jenis tempe.

Skor intensitas rasa pahit tempe EMP, DRG, MLB, CLR, dan WJB secara signifikan berbeda. Hasil uji *Honestly Significant Difference* (HSD) pada taraf 5% (Gambar 4) menunjukkan bahwa skor intensitas rasa pahit tempe EMP, DRG, MLB, CLR, dan WJB dikategorikan dalam tiga kelompok, yaitu skor tertinggi tempe EMP (2.3) dan DRG (2.2), skor menengah yaitu tempe MLB (1.7) dan CLR (1.6), dan skor terendah adalah tempe WJB (1.3). Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak signifikan berbeda pada uji HSD taraf 5% (Gambar 4). Berdasarkan hasil uji sensori tersebut, selanjutnya tempe EMP yang memiliki skor tertinggi (2.3) digunakan sebagai wakil tempe rasa “pahit” dan tempe WJB yang

memiliki skor terendah (1.3) mewakili tempe rasa “tidak pahit”, yang selanjutnya disebut tempe EMP dan tempe WJB saja. Berdasarkan persepsi panelis, dari lima jenis tempe yang diuji, ternyata tempe WJB yang paling disukai, sedangkan tempe EMP yang paling tidak disukai.

Hasil uji sensori menunjukkan bahwa rasa pahit selalu ditemukan pada tempe, namun intensitasnya dapat berbeda pada tempe yang diproduksi pengrajin. Rasa pahit tersebut dapat disebabkan oleh jenis kedelai yang digunakan, cara pembuatan, atau mikroorganisme yang berperan selama pengolahan berlangsung.

Jenis kedelai yang digunakan dapat menyebabkan rasa pahit pada tempe sebab menurut Rouseff (1990), jenis kedelai tertentu memiliki asam lemak *hydroxy* yang memiliki rasa pahit akibat adanya lipoxigenase. Namun demikian, perbedaan intensitas rasa pahit antara lima jenis tempe yang diuji, termasuk antara tempe EMP dan tempe WJB bukan disebabkan oleh jenis kedelai, karena kelima jenis tempe diproduksi dari jenis kedelai yang sama, yaitu GCU, USA Soybean No.1. Oleh sebab itu, perlu dianalisis lebih lanjut faktor penyebab perbedaan intensitas rasa pahit pada kedua jenis tempe tersebut.

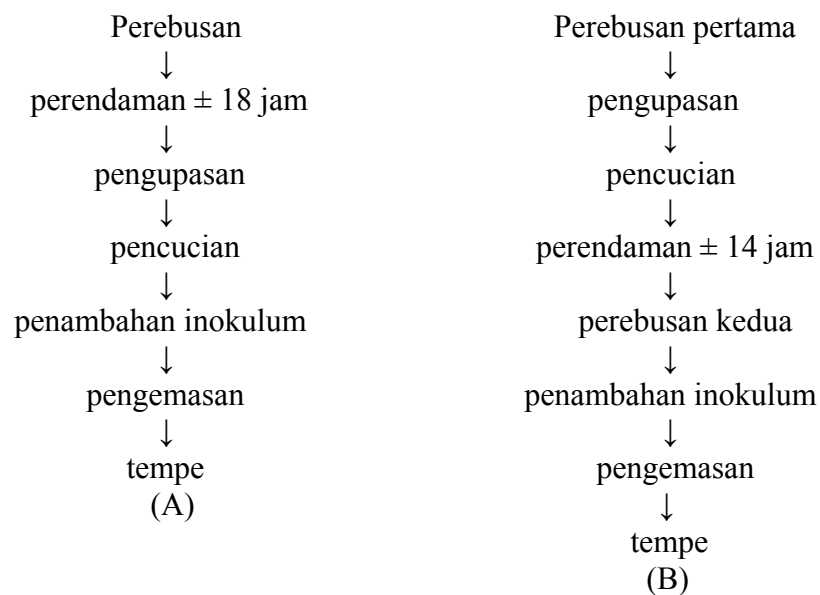
Pengaruh Perbedaan Proses Pembuatan terhadap Rasa Pahit Tempe

Tempe pada umumnya diproduksi oleh pengrajin pada skala industri kecil (industri rumah tangga). Pembuatan tempe dilakukan dengan cara yang sangat bervariasi oleh para pengrajin, yang berkembang secara turun menurun dan berubah karena pengalaman. Pembuatan tempe yang dimaksud dalam hal ini adalah tahapan-tahapan yang dilakukan oleh pengrajin terhadap kedelai hingga dihasilkan tempe yang siap dikonsumsi. Menurut Karyadi (1996), terdapat beberapa tahapan proses dasar yang tetap diterapkan oleh para pengrajin tempe di Indonesia, yaitu: kedelai direbus, dikupas, dicuci, dan direndam sampai asam, lalu dicampur inokulum. Namun, tahapan proses dasar ini dapat juga berbeda antar pengrajin karena adanya pengalaman dan faktor lain sehingga terjadi modifikasi pada setiap tahapannya.

Tempe EMP dan DRG memiliki intensitas rasa pahit yang signifikan berbeda dibandingkan dengan tempe MLB dan CLR (Gambar 4). Keempat jenis tempe tersebut

diproduksi dengan cara yang sama (Gambar 5). Berarti intensitas rasa pahit tempe dapat berbeda antar pengrajin walaupun diproduksi dengan cara yang sama. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Hartoyo (1994).

Tempe EMP dan WJB memiliki intensitas rasa pahit yang signifikan berbeda (Gambar 4). Kedua jenis tempe diproduksi oleh pengrajin tempe dengan cara pembuatan yang berbeda. Seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya bahwa cara pembuatan yang dimaksud adalah tahapan-tahapan pengolahan kedelai hingga tempe siap dikonsumsi (Gambar 5). Oleh sebab itu, untuk lebih memastikan pengaruh cara pembuatan tempe terhadap rasa pahit, maka diproduksi tempe pada skala laboratorium melalui kedua cara pembuatan tempe tersebut. Tujuannya adalah untuk lebih memastikan apakah perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB tersebut disebabkan karena perbedaan cara pembuatan atau karena faktor lain. Saat pembuatan tempe, faktor-faktor selain cara pembuatan, yaitu: jenis kedelai, jenis inokulum, dan sumber air yang digunakan adalah sama. Dengan demikian maka apabila terdapat perbedaan intensitas rasa pahit antara kedua jenis tempe yang diproduksi, maka perbedaan tersebut disebabkan oleh perbedaan cara pembuatan.



Gambar 5 Tahapan pembuatan tempe yang dilakukan oleh pengrajin tempe EMP, DRG, MLB, CLR (A) dan WJB (B).

Hasil uji sensori menunjukkan bahwa intensitas rasa pahit kedua jenis tempe yang diproduksi dengan cara pembuatan berbeda tidak signifikan berbeda, yaitu masing-masing dengan skor 1.1 dan 1.2. Dengan demikian maka perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB bukan disebabkan karena perbedaan cara pembuatan (Gambar 5), namun disebabkan karena faktor lain.

Dari eksperimen yang telah dilakukan pada penelitian ini, hasilnya menunjukkan bahwa perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB bukan karena faktor jenis kedelai dan cara pembuatan tempe. Oleh sebab itu, diduga mikroorganisme berpengaruh terhadap perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB, sehingga perlu diteliti lebih lanjut.

Kondisi Umum Proses Pembuatan Tempe EMP dan Tempe WJB

Kunjungan ke pengrajin tempe EMP dan WJB dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang kondisi pengolahan tempe EMP dan WJB. Hasil pengamatan di lokasi pengrajin tempe EMP dan WJB diperoleh informasi tentang keadaan umum proses pembuatan kedua jenis tempe tersebut (Tabel 1).

Kondisi proses pembuatan tempe WJB lebih higienis dibandingkan dengan kondisi proses pembuatan tempe EMP. Saat pembuatan tempe WJB, semua alat-alat yang digunakan dan ruangan pembuatan dalam keadaan bersih. Ruang perendaman dan pemeraman dalam keadaan tertutup. Sumber air yang digunakan berasal dari air PAM. Kondisi ini sangat berbeda dengan proses pembuatan tempe EMP, dimana proses perendaman dan pemeraman dilakukan di ruangan yang tidak tertutup. Peralatan yang digunakan dan ruangan pembuatan, terutama saat perendaman sangat tidak higienis. Sumber air yang digunakan berasal dari sumur.

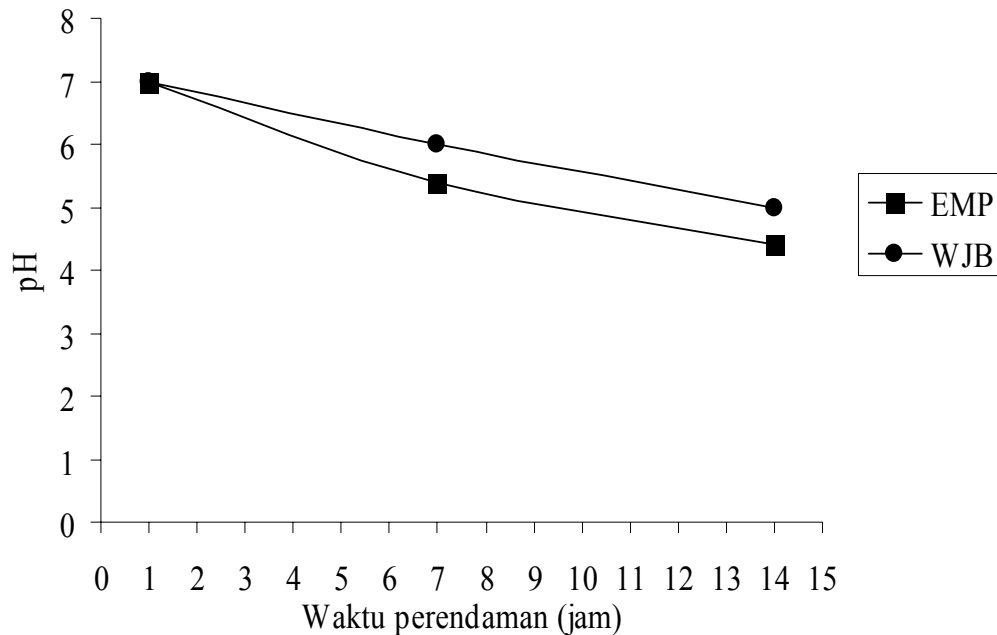
Perbedaan kondisi selama proses pembuatan antara tempe EMP dan tempe WJB, dan perbedaan sumber air yang digunakan memungkinkan terjadinya perbedaan komunitas mikroorganisme selama pembuatan berlangsung. Komunitas mikroorganisme sangat mempengaruhi kualitas bahan pangan yang diproduksi melalui proses fermentasi.

Tabel 1 Keadaan umum proses pembuatan tempe EMP dan tempe WJB.

Kondisi	Tempe EMP	Tempe WJB
Perebusan pertama	kedelai sampai matang	kedelai sampai matang
Pengasaman	± 18 jam	± 14 jam
Perebusan kedua	-	± 2 jam
Pemberian inokulum	kedelai direndam bersama inokulum	kedelai diaduk dengan inokulum
Pemeraman	dalam plastik	disebar pada ubin
Pengemasan	plastik berlubang	plastik berlubang
Waktu inkubasi	± 36 jam	± 36 jam
Sumber air	air sumur	air ledeng
Alat pengupas	mesin	mesin
Wadah pengolahan	drum kaleng	drum kaleng
Wadah peniris	kantong plastik	nyiru bambu
Jenis inokulum	LIPI + onggok	LIPI
pH rendaman awal	7.0	7.0
pH pertengahan	5.4	6.0
pH rendaman akhir	4.4	5.0
Air rendaman	sangat kental berwarna kuning	agak kental berwarna putih

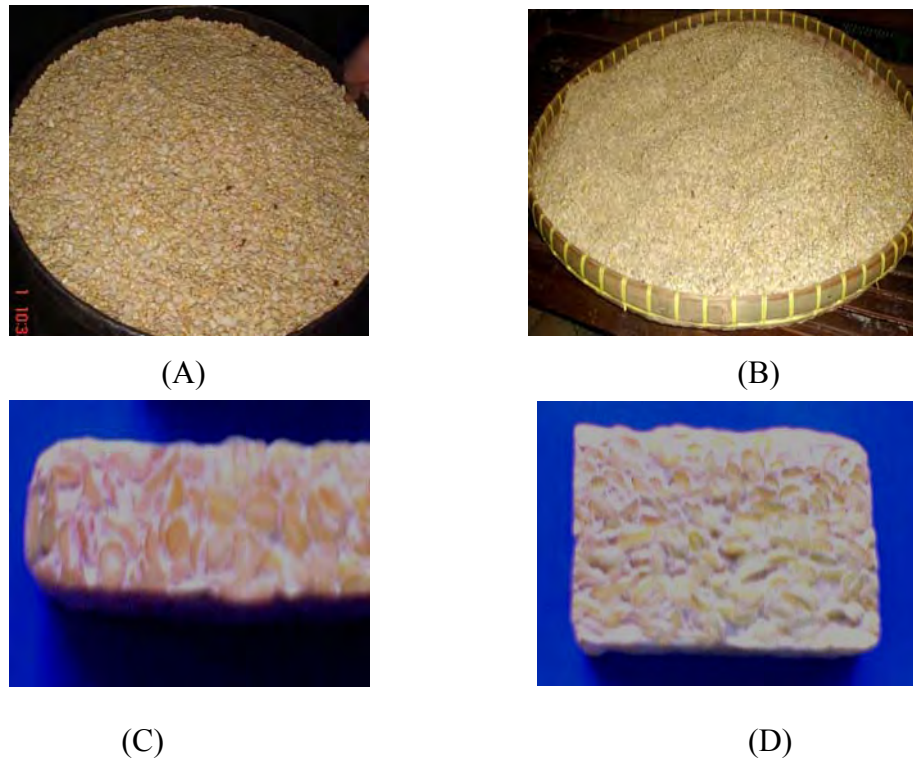
Salah satu tahapan pembuatan tempe adalah proses pengasaman melalui proses perendaman kedelai yang telah direbus. Pada awal perendaman, pH air rendaman kedelai tempe EMP dan tempe WJB tidak berbeda, yaitu masing-masing 7 (Gambar 6). Pada 7 dan 14 jam setelah perendaman, pH air rendaman kedelai tempe EMP menjadi 5.4 dan 4.4, sementara pH air rendaman kedelai tempe WJB 6.0 dan 5.0 (Gambar 6). Tampak bahwa pada 7 dan 14 jam setelah perendaman, pH air rendaman kedelai tempe EMP lebih rendah dibandingkan dengan pH air rendaman

kedelai tempe WJB. Perbedaan penurunan pH antara tempe EMP dan tempe WJB ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan komunitas bakteri antara kedua jenis tempe tersebut.



Gambar 6 pH air rendaman kedelai tempe EMP dan tempe WJB selama 14 jam proses perendaman

Selain perbedaan pH, kekentalan air rendaman juga berbeda. Air rendaman tempe EMP lebih kental dibandingkan dengan tempe WJB (tidak dilakukan pengukuran). Selain itu, kedelai tempe EMP berwarna coklat kekuningan dan tempe segarnya berwarna coklat kekuningan dengan jalinan miselium kapang berwarna putih, sementara kedelai tempe WJB berwarna kuning bersih dan tempe segarnya berwarna kuning bersih dengan jalinan miselium kapang berwarna putih (Gambar 7).



Gambar 7 Penampilan kedelai tempe EMP yang telah direndam (A), kedelai tempe WJB yang telah direndam (B), tempe segar EMP (C), dan tempe segar WJB (D).

Perbedaan pH dan warna air rendaman kedelai antara tempe EMP dan tempe WJB kemungkinan disebabkan oleh perbedaan komunitas mikroorganisme yang terdapat selama perendaman berlangsung. Tampaknya perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB telah terbentuk sejak perendaman kedelai berlangsung, sebab berdasarkan persepsi panelis, kedelai tempe WJB yang telah direndam dan siap diberi inokulum tidak pahit dan tidak asam, sementara kedelai tempe EMP agak pahit, dan asam. Tampaknya, proses perendaman kedelai pada pembuatan tempe merupakan salah faktor penting dalam pembentukan cita rasa tempe, sebab kualitas tempe yang dihasilkan sudah diawali dari proses tersebut.

Jumlah dan Jenis Kapang

Analisis terhadap kapang dilakukan untuk mengetahui perbedaan jenis dan jumlah kapang yang terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB. Tujuannya adalah

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

untuk mengetahui apakah kapang yang menyebabkan perbedaan intensitas rasa pahit terhadap kedua jenis tempe tersebut.

Peran kapang terhadap rasa pahit perlu dikaji, sebab kapang merupakan mikroorganisme utama yang berperan saat proses pembuatan tempe. Jenis kapang yang paling berperan adalah kelompok *Rhizopus*. Jenis *Rhizopus* berperan mempengaruhi kualitas tempe, sebab *Rhizopus* terdiri atas berbagai jenis yang memiliki karakteristik sendiri (Nout & Kiers 2005). Hasil penelitian Keuth dan Bisping (1995) menunjukkan bahwa dari beberapa jenis *Rhizopus* yang digunakan untuk memproduksi tempe, *R. oligosporus* merupakan jenis yang memiliki aktivitas proteolitik tertinggi dibandingkan dengan *R. oryzae* dan *R. stolonifer*.

Mikroorganisme yang memiliki aktivitas proteolitik penting dalam proses pembuatan tempe, sebab hidrolisis enzimatik protein kedelai dapat menyebabkan timbulnya rasa pahit akibat terbentuknya molekul peptida yang bersifat hidrofobik (Reineccius, 1994), yaitu peptida yang memiliki berat molekul sekitar 2.4 -3.5 kDa (Kim *et al.* 2003), dan peptida yang berukuran 2 kDa dan 4 kDa (Myong *et al.* 2004). Lebih lanjut dilaporkan bahwa kapang berperan pada pembentukan karakteristik flavor tempe karena tempe yang diproduksi dengan *R. oryzae* menghasilkan flavor yang tidak diinginkan.

Berdasarkan hasil analisis kapang yang dilakukan, ditemukan bahwa kapang yang terdapat pada tempe segar EMP adalah *R. oligosporus* dan *Mucor* sp. masing-masing dengan kelimpahan 3.4×10^5 CFU g⁻¹ dan 3.5×10^3 CFU g⁻¹. Jenis kapang yang terdapat pada tempe segar WJB adalah *R. oligosporus*, *Mucor* sp. dan *Geotrichum* sp, masing-masing dengan kelimpahan 3.8×10^5 CFU g⁻¹, 4.8×10^3 CFU g⁻¹, dan kurang dari 3.0×10^1 CFU g⁻¹. Jenis dan jumlah kapang yang terdapat pada tempe EMP dan WJB relatif sama. Oleh sebab itu maka tampaknya kapang tidak berperan dalam menyebabkan perbedaan intensitas rasa pahit pada kedua jenis tempe tersebut. Namun, untuk lebih memastikan tentang pengaruh kapang terhadap perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB, maka diproduksi tempe pada skala laboratorium dengan menggunakan inokulum dari pengrajin tempe EMP

dan WJB. Hal ini karena inokulum merupakan sumber kapang yang terdapat pada tempe.

Pada saat produksi tempe, jenis kedelai, cara pembuatan, dan sumber air yang digunakan sama. Prosedur pembuatan tempe dilakukan mengikuti cara yang digunakan pengrajin tempe WJB (Gambar 5). Selanjutnya, dilakukan uji sensori terhadap tempe yang diproduksi untuk menentukan perbedaan intensitas rasa pahitnya.

Hasil uji sensori dua jenis tempe yang diproduksi pada skala laboratorium menggunakan inokulum dari pengrajin tempe EMP dan WJB menunjukkan skor intensitas rasa pahit yang tidak signifikan berbeda, yaitu masing-masing dengan skor 1.1 dan 1.2. Hasil tersebut semakin memperkuat informasi yang menunjukkan bahwa perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB bukan disebabkan oleh kapang.

Jenis inokulum yang digunakan oleh pengrajin tempe EMP dan WJB berasal dari sumber yang sama, yaitu inokulum dengan merek dagang Raprima yang diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi, Bandung. Namun, pengrajin EMP terlebih dahulu mencampur inokulum tersebut dengan onggok untuk menghemat biaya pengadaan inokulum. Namun, hasil uji sensori dua jenis tempe menggunakan inokulum dari kedua pengrajin menunjukkan bahwa pencampuran onggok oleh pengrajin tempe EMP bukan penyebab perbedaan intensitas rasa pahit antara kedua jenis tempe tersebut.

Geotrichum sp. tidak ditemukan pada tempe EMP, tetapi ditemukan pada tempe WJB dengan jumlah kurang dari 3.0×10^1 CFU g^{-1} (11 CFU g^{-1}). Jumlah *Geotrichum* sp. tersebut relatif sangat rendah bila dibandingkan dengan jumlah mikroorganisme lainnya yang terdapat pada tempe WJB. Dengan demikian maka peranannya juga relatif sangat kecil dalam mempengaruhi rasa pahit pada tempe. Oleh sebab itu, rendahnya intensitas rasa pahit tempe WJB dibandingkan dengan tempe EMP bukan disebabkan oleh *Geotrichum* sp.

Analisis Komunitas Bakteri Secara Konvensional

Perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB bukan disebabkan oleh jenis kedelai, cara pembuatan, dan kapang. Oleh sebab itu perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB kemungkinan disebabkan karena perbedaan komunitas bakteri selama proses pembuatan berlangsung.

Untuk mengetahui lebih lanjut faktor penyebab perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB, maka dianalisis perbedaan komunitas bakteri pada kedua jenis tempe, baik secara konvensional (pengkulturan bakteri) dan secara molekular dengan teknik T-RFLP. Tujuannya agar dapat dibandingkan keadaan komunitas bakteri yang terdapat pada tempe EMP dan WJB.

Jenis media yang dipakai pada analisis komunitas bakteri secara konvensional adalah PCA dan EMB. Media PCA digunakan sebab media ini adalah jenis media yang direkomendasikan untuk menumbuhkan total jenis bakteri aerob yang terdapat pada bahan makanan. Demikian juga EMB digunakan sebab merupakan jenis media untuk menumbuhkan golongan bakteri gram negatif.

Jumlah sel *Enterobacteria* dan bakteri pembentuk spora pada air rendaman dan pada tempe segar EMP lebih tinggi dibandingkan dengan air rendaman dan tempe segar WJB. *Enterobacteria* dan bakteri berspora secara berturut-turut sekitar 1.5×10^3 - 5×10^3 dan 2×10^1 - 3×10^2 kali lebih banyak terdapat pada air rendaman tempe EMP dibandingkan tempe WJB. Demikian juga pada tempe segar, total bakteri mesofil, *Enterobacteria*, dan bakteri berspora secara berturut-turut sekitar 5×10^2 , 2×10^2 , dan 2×10^1 kali lebih banyak terdapat pada tempe EMP dibandingkan tempe WJB (Tabel 2).

Tabel 2 Kelimpahan beberapa jenis bakteri yang terdapat pada air rendaman dan tempe segar EMP dan WJB.

Jenis bakteri	Lama perendaman kedelai			Tempe segar (CFU/g)
	1 jam (CFU/ml)	7 jam (CFU/ml)	14 jam (CFU/ml)	
	Tempe EMP			
Total bakteri	8.7×10^6	4.4×10^7	3.7×10^8	9.4×10^8
Enterobacteria	3.1×10^6	7.7×10^7	3.3×10^8	1.1×10^8
Bakteri berspora	3.4×10^2	3.3×10^3	5.3×10^3	3.2×10^2
	Tempe WJB			
Total bakteri	7.1×10^6	1.3×10^7	7.6×10^8	1.8×10^6
Enterobacteria	6.1×10^2	5.3×10^4	6.0×10^5	4.2×10^5
Bakteri berspora	$< 3.0 \times 10^1$	$< 3.0 \times 10^1$	$< 3.0 \times 10^1$	$< 3.0 \times 10^1$

Semua bakteri berspora dalam penelitian ini bersifat proteolitik

Berdasarkan morfologinya, *Enterobacteria* pada tempe EMP didominasi oleh bakteri yang berwarna hijau metalik (fekal), dan selainnya non fekal yang serupa dengan bakteri *Enterobacteria* yang terdapat pada tempe WJB. Kelompok *Enterobacteria* pada tempe EMP yang berwarna hijau metalik tersebut kemungkinan adalah *Escherichia coli*.

Berdasarkan data analisis komunitas bakteri (Tabel 2) menunjukkan bahwa mikroorganisme yang berperan selama proses pembuatan tempe sangatlah kompleks. Mikroorganisme yang paling berperan adalah kapang, khususnya kelompok *Rhizopus*. Namun demikian, bakteri terdapat dalam kelimpahan yang tinggi sejak awal hingga akhir proses pembuatan tempe. Dengan demikian, kemungkinan komunitas bakteri berpengaruh terhadap rasa pahit tempe.

Proses pembuatan tempe secara tradisional pada umumnya dilakukan pada kondisi yang tidak aseptik, sehingga bakteri berkembang dengan baik. Namun, peranan bakteri terhadap pembentukan rasa, tekstur, dan nutrisi tempe masih perlu dikaji lebih lanjut.

Dua jenis bakteri yang tumbuh dominan pada media PCA yang diamati secara morfologi (Cappuccino & Sherman 2001), selanjutnya diidentifikasi. Berdasarkan ciri morfologinya, maka jenis bakteri yang terdapat dominan pada sampel tempe EMP

bertipe A, B, F, dan I, sedangkan pada tempe WJB bertipe B, D, G, H dan I (Tabel 3). Bakteri Tipe I memiliki aktivitas proteolitik, dan tipe morfologi koloninya sama dengan bakteri berspora yang terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB, yaitu: berbentuk tidak beraturan dan menyebar, berlendir, rata, putih, dan besar. Bakteri berspora juga memiliki aktivitas proteolitik. Secara keseluruhan kelimpahan bakteri yang bersifat proteolitik terdapat lebih tinggi pada tempe EMP dibandingkan dengan tempe WJB.

Identifikasi dua jenis bakteri yang paling dominan dilakukan berdasarkan sekuensing gen 16S rRNA. Hasil sekuensing DNA menunjukkan bahwa jenis bakteri mesofil yang dominan pada tempe EMP ialah *Acetobacter indonesiensis* (Tipe A), *Bacillus subtilis* (Tipe I), *Klebsiella pneumoniae* (Tipe B), dan *Flavobacterium* sp.(Tipe F), sedangkan jenis bakteri mesofil yang dominan pada tempe WJB adalah *Klebsiella* sp. (Tipe B), *Bacillus pumilus* (Tipe I), *Pseudomonas putida* (Tipe D), dan *Acinetobacter* sp. (Tipe H) (Tabel 3). Masing-masing dengan tingkat kemiripan 99%-100%.

Pada tempe EMP, *Klebsiella pneumonia* yang terdapat pada air rendaman masih ditemukan juga pada tempe segarnya. Hal ini kemungkinan karena setelah perendaman kedelai tidak dilakukan lagi perebusan kembali sehingga kemungkinan jenis bakteri yang terdapat pada air rendaman bakteri masih terikut selama inkubasi.

Bacillus terdapat lebih tinggi sekitar 9×10^4 kali lebih banyak terdapat pada air rendaman kedelai tempe EMP dibandingkan dengan tempe WJB. Kedua jenis *Bacillus* tersebut (Tabel 3) bersifat proteolitik. *Bacillus* bersifat sangat kuat mensekresikan enzim protease sehingga dapat menghidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil (Suhartono 1992). Oleh sebab itu, walaupun banyak faktor kemungkinan yang menyebabkan perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB, namun perbedaan kelimpahan dan jenis *Bacillus* yang terdapat selama proses pengolahan kemungkinan berperan menyebabkan terjadinya perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB. Omafuvbe *et al.* (2002) melaporkan bahwa protease *Bacillus* sp. yang berbeda dapat menghasilkan kadar asam amino bebas dan atribut sensori yang berbeda pada *soy-daddawa*

(makanan tradisional Nigeria hasil fermentasi kedelai). Lebih lanjut, hasil penelitian Myung *et al.* 2007 menunjukkan bahwa jenis *Bacillus* tertentu berperan pada pembentukan rasa pahit pada chungkukjangs (makanan tradisional Korea hasil fermentasi kedelai).

Tabel 3 Dua jenis bakteri yang dominan dari EMP dan WJB yang tumbuh pada media PCA

Contoh	Tipe koloni	Identitas	CFUml ⁻¹ CFU g ⁻¹	Distri-busi (%)
Tempe EMP				
Rendaman 1 (AE1)	A	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	5.5 x 10 ⁶	64%
	I	<i>Bacillus subtilis</i> *	3.1 x 10 ⁶	35%
Rendaman 2 (AE2)	B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.7 x 10 ⁷	85%
	I	<i>Bacillus subtilis</i>	6.6 x 10 ⁶	15%
Rendaman 3 (AE3)	B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.7 x 10 ⁸	99.9%
	I	NA	4.7 x 10 ⁵	<1%
Tempe segar (TE)	F	<i>Flavobacterium</i> sp.	5.9 x 10 ⁸	62.7%
	B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.5 x 10 ⁸	37.2%
Tempe WJB				
Rendaman 1 (AW1)	B	<i>Klebsiella</i> sp.	7.1 x 10 ⁶	99.9%
	I	<i>Bacillus pumilus</i> *	3.3 x 10 ¹	<1%
Rendaman 2 (AW2)	B	<i>Klebsiella</i> sp.	1.3 x 10 ⁷	99.9%
	G	<i>Brevundimonas</i> sp.	3.5 x 10 ³	<1%
Rendaman 3 (AW3)	B	NA	7.6 x 10 ⁸	99.9%
	G	NA	3.0 x 10 ⁵	<1%
Tempe segar (TW)	D	<i>Pseudomonas putida</i>	1.7 x 10 ⁶	99.9%
	H	<i>Acinetobacter</i> sp.	5.4 x 10 ³	<1%

Tipe A: Bundar, tepian licin, berlendir, cembung, putih kekuningan, kecil.

Tipe B: Bundar, tepian licin, berlendir, cembung, putih, kecil.

Tipe D: Bundar, tepian licin, berlendir, cembung, putih, besar.

Tipe F: Bundar dengan tepian kerang, berlendir, cembung, putih kecoklatan, besar.

Tipe G: Bundar, tepian licin, berlendir, cembung, putih, sedang.

Tipe H: Bundar, tepian licin, berlendir, timbul, putih kekuningan, kecil.

Tipe I: Tidak beraturan dan menyebar, berlendir, rata, putih, besar.

NA : tidak diidentifikasi.

* : bersifat proteolitik

Kedelai sebagai bahan baku pembuatan tempe mengandung sekitar 40% protein dari total berat keringnya, yang terdiri atas protein 11S glycinin dan protein α , β , γ conglycinin (Liu 1997). Hidrolis protein 11S glysinin kedelai oleh tripsin

menghasilkan peptida yang pahit, yaitu peptida yang memiliki berat molekul antara 2.4 - 3.5 kDa (Kim *et al.* 2003). Rasa pahit pada hidrolisis enzimatis protein kedelai disebabkan karena terbentuknya molekul peptida yang bersifat hidrofobik (Reineccius 1994). Selanjutnya ditambahkan oleh Myong *et al.* (2004) bahwa hidrolisis protein kedelai oleh enzim menyebabkan timbulnya rasa pahit akibat terbentuknya peptida yang berukuran sekitar 2 kDa dan 4 kDa.

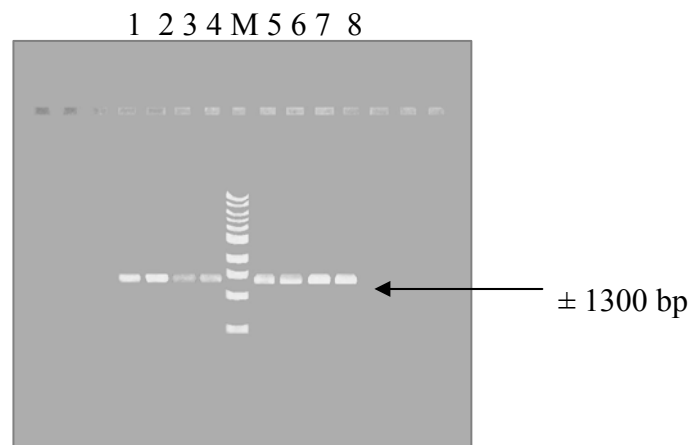
Analisis Komunitas Bakteri dengan Teknik T-RFLP

Intensitas rasa pahit tempe EMP dan tempe WJB secara signifikan berbeda. Telah dianalisis bahwa perbedaan intensitas rasa pahit tersebut bukan disebabkan oleh jenis kapang, cara pembuatan, dan jenis kedelai yang digunakan. Namun, dari hasil analisis komunitas bakteri secara konvensional (analisis berdasarkan pengkulturan bakteri) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jenis dan kelimpahan bakteri yang terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB.

Untuk mengetahui lebih lanjut tentang perbedaan jenis dan kelimpahan bakteri antara tempe EMP dan tempe WJB, maka dilakukan analisis komunitas bakteri metode molekular, sebab apabila hanya berdasarkan analisis secara konvensional saja hasilnya dapat bias karena bisa tidak menggambarkan keadaan komunitas bakteri yang sesungguhnya. Hal ini karena sebagian besar bakteri belum dapat ditumbuhkan pada media untuk skala laboratorium (Giraffa & Neviani 2001). Oleh sebab itu, analisis komunitas bakteri tempe EMP dan tempe WJB dilakukan lebih lanjut dengan teknik T-RFLP, agar lebih jelas diketahui perbedaan jenis dan kelimpahan bakteri antara kedua jenis tempe tersebut.

Analisis T-RFLP digunakan untuk melakukan perbandingan dan deteksi spesies bakteri yang menghuni suatu ekosistem. Teknik T-RFLP telah digunakan untuk membandingkan komunitas bakteri pada tanah (Dunbar *et al.* 2000), menganalisis keragaman bakteri yang menyebabkan infeksi paru-paru (Rogers *et al.* 2004), menganalisis keragaman bakteri pada vagina (Coolen *et al.* 2005), dan mendeteksi kehadiran bakteri pada darah (Christensen *et al.* 2003).

Analisis komunitas bakteri pada kedua jenis tempe dengan teknik T-RFLP dilakukan berdasarkan pada analisis gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA tersebut berukuran sekitar 1300 bp (Gambar 8).



Gambar 8 Elektroforesis gel agarose (0.8%) DNA gen 16S rRNA komunitas bakteri dari tempe EMP dan WJB.

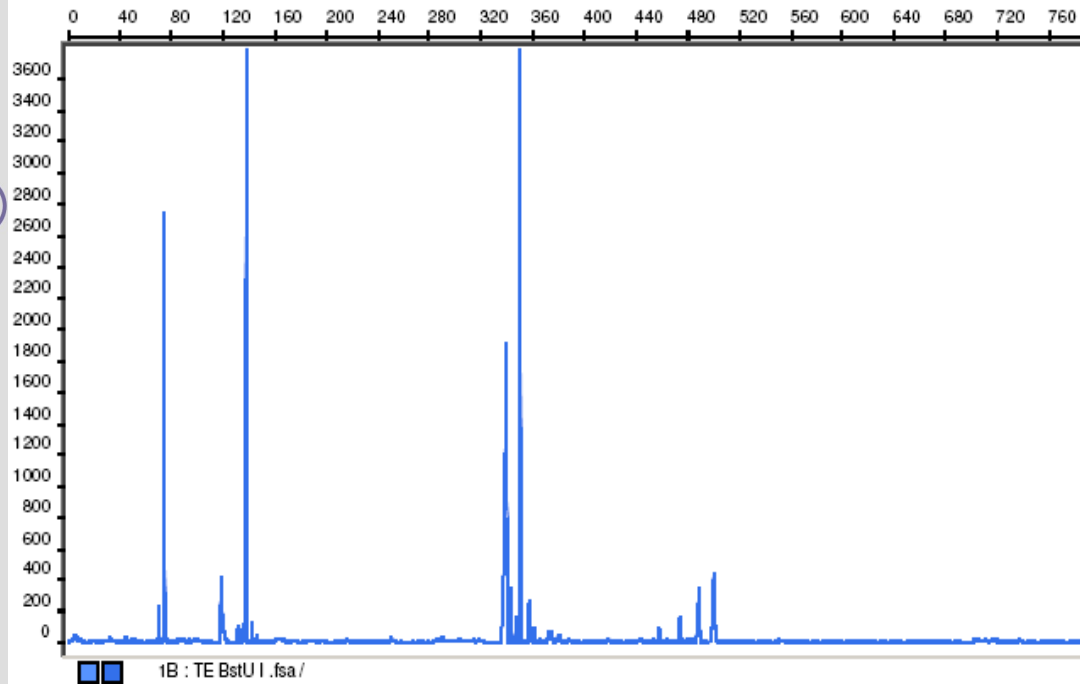
- 1 : 1 jam perendaman kedelai WJB (AW1)
- 2 : 7 jam perendaman kedelai WJB (AW2)
- 3 : 14 jam perendaman kedelai WJB (AW3)
- 4 : Tempe segar WJB (TW)
- M : Marker 100 bp
- 5 : Tempe segar EMP (TE)
- 6 : 14 jam perendaman kedelai EMP (AE3)
- 7 : 7 jam perendaman kedelai EMP (AE2)
- 8 : 1 jam perendaman kedelai EMP (AE1)

Hasil analisis T-RFLP berupa elektrogram yang memperlihatkan grafik ukuran fragment ujung 5' yang terlabel ditambah dengan informasi pada tabel tentang TRF tersebut di bagian bawahnya (Gambar 9). Setiap puncak grafik mewakili minimal satu TRF gen 16S rRNA bakteri yang terdapat di dalam contoh. Ketinggian grafik menunjukkan intensitas pendaran TRF. Pembacaan data yang terdapat di bawah grafik dari kiri ke kanan (Gambar 9) adalah sebagai berikut: kolom pertama

merupakan nomor urut keluarnya TRF, kolom kedua waktu keluarnya TRF (menit), kolom ketiga ukuran TRF (bp), kolom keempat intensitas pendaran TRF (unit fluoresens), kolom kelima luas area grafik (mm), dan kolom keenam titik keluarnya data pada alat.

Berdasarkan hasil analisis T-RFLP, jenis bakteri pada suatu ekosistem dapat diduga dari jenis TRF yang dihasilkan, yaitu dengan mencocokkan jenis TRF tersebut dengan *database* (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>), dan kelimpahan relatifnya ditunjukkan oleh tinggi puncak (*peak height*) atau luas area (*peak area*) grafik TRF (Gambar 9). Dalam penelitian ini kelimpahan relatif jenis bakteri digunakan tinggi puncak grafik TRF.

Untuk menganalisis komunitas bakteri pada tempe EMP dan WJB dengan T-RFLP ini digunakan dua jenis enzim, yaitu *Bst*UI dan *Msp*I. Hasil T-RFLP menunjukkan bahwa kedua jenis enzim ini mampu membuat perbedaan antara gen 16S rRNA bakteri yang satu dengan yang lainnya. Namun, untuk pembahasan lebih lanjut dipilih hasil T-RFLP yang dipotong dengan enzim *Bst*UI, karena total intensitas pendaran TRF pada tempe WJB yang dipotong dengan *Bst*UI jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pemakaian enzim *Msp*I.



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1B, 1	10.34	45.56	50	422	2819
1B, 2	11.22	70.50	258	2173	3060
1B, 3	11.43	75.00	3130	16628	3117
1B, 4	11.47	76.01	61	504	3126
1B, 5	12.32	118.90	481	3970	3360
1B, 6	12.56	131.76	113	829	3425
1B, 7	12.61	134.40	95	481	3439
1B, 8	12.65	136.49	143	963	3450
1B, 9	12.70	139.00	6194	32972	3463
1B, 10	12.75	139.48	100	801	3475
1B, 11	13.22	143.18	144	1005	3604
1B, 12	13.82	146.90	61	1184	3767
1B, 13	15.33	251.18	51	398	4179
1B, 14	15.84	290.24	54	585	4318
1B, 15	16.42	340.00	1964	33009	4476
1B, 16	16.63	343.15	378	2634	4534
1B, 17	16.95	346.63	178	1914	4621
1B, 18	17.20	349.10	142	1091	4690
1B, 19	17.29	350.00	7705	90317	4715
1B, 20	17.62	357.88	309	3095	4805
1B, 21	17.73	360.72	106	736	4835
1B, 22	18.18	373.86	75	1717	4958
1B, 23	18.36	379.76	59	672	5005
1B, 24	18.37	380.16	60	159	5008
1B, 25	18.39	380.96	71	629	5014

Gambar 9 Contoh hasil analisis komunitas bakteri dengan T-RFLP. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

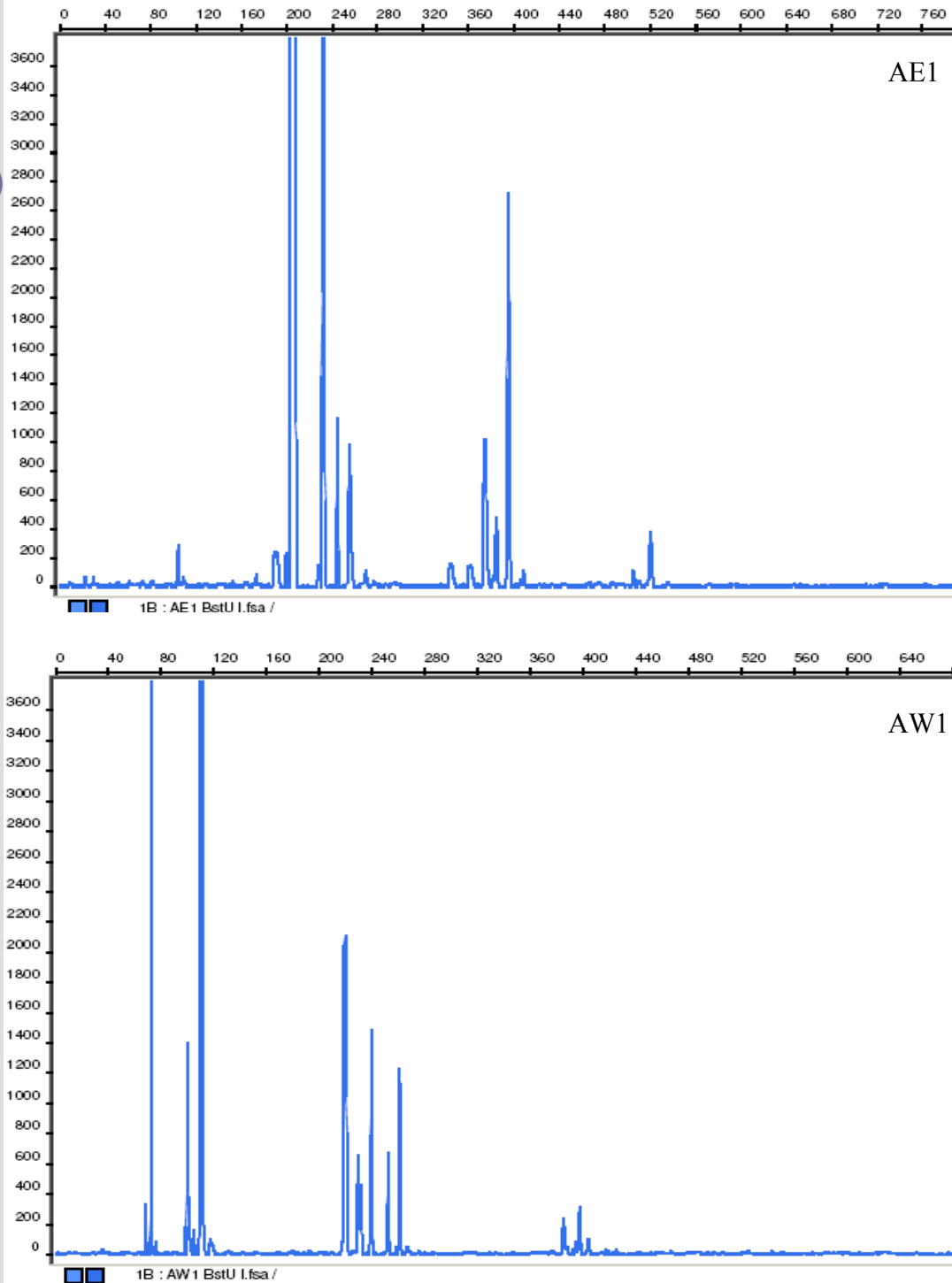
Bogor Agricultural Uni

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Apabila dibandingkan profil hasil T-RFLP komunitas bakteri antara tempe EMP dan tempe WJB pada setiap tahapannya (AE1 dan AW1, AE2 dan AW2, AE3 dan AW3, serta TE dan TW) maka keduanya tampak berbeda (Gambar 10, Gambar 11, Gambar 12, Gambar 13). Perbedaan ini menggambarkan perbedaan profil komunitas bakteri yang terdapat pada kedua jenis tempe tersebut. Hasil T-RFLP selengkapnya ditunjukkan pada Lampiran 1-8 dan rangkuman data ditunjukkan pada Tabel 4.

Hasil analisis komunitas bakteri dengan T-RFLP (Tabel 4) menunjukkan bahwa pada AE1, AE2, AE3, dan TE secara berturut-turut ditemukan 25, 23, 24, dan 29 jenis TRF, dan pada AW1, AW2, AW3, dan TW secara berturut-turut ditemukan 29, 18, 24, dan 29 TRF. Hasil T-RFLP ini menunjukkan bahwa pada AE1, AE2, AE3, dan TE secara berturut-turut ditemukan minimal 25, 23, 24, dan 29 jenis bakteri, dan pada AW1, AW2, AW3, dan TW secara berturut-turut ditemukan minimal 29, 18, 24, dan 29 jenis bakteri.

Jenis bakteri pada tempe EMP dan tempe WJB mungkin bahkan dapat bertambah sebab satu TRF menggambarkan minimal 1 jenis bakteri. Hasil analisis komunitas ini menunjukkan bahwa komunitas bakteri selama proses pengolahan tempe sangat kompleks. Kompleksnya jenis mikroorganisme yang terlibat selama proses fermentasi telah ditemukan juga pada fermentasi Pozol (makanan tradisional Indian dari jagung) yang melibatkan sekitar 139 strain bakteri (Ampe *et al.* 1999).



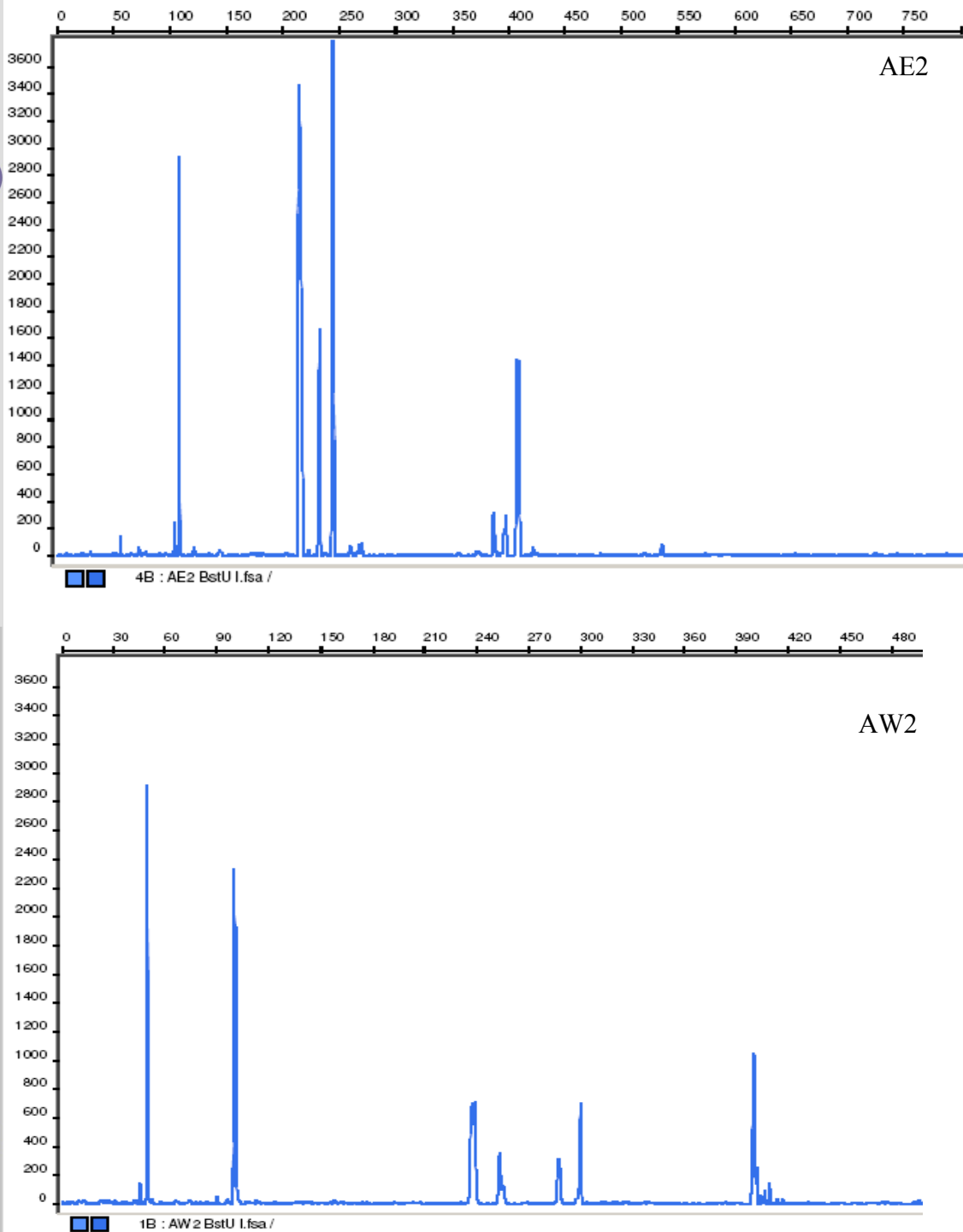
Gambar 10 Profil TRF gen 16S rRNA bakteri AE1 (1 jam perendaman kedelai tempe EMP) dan AW1 (1 jam perendaman kedelai tempe WJB) yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



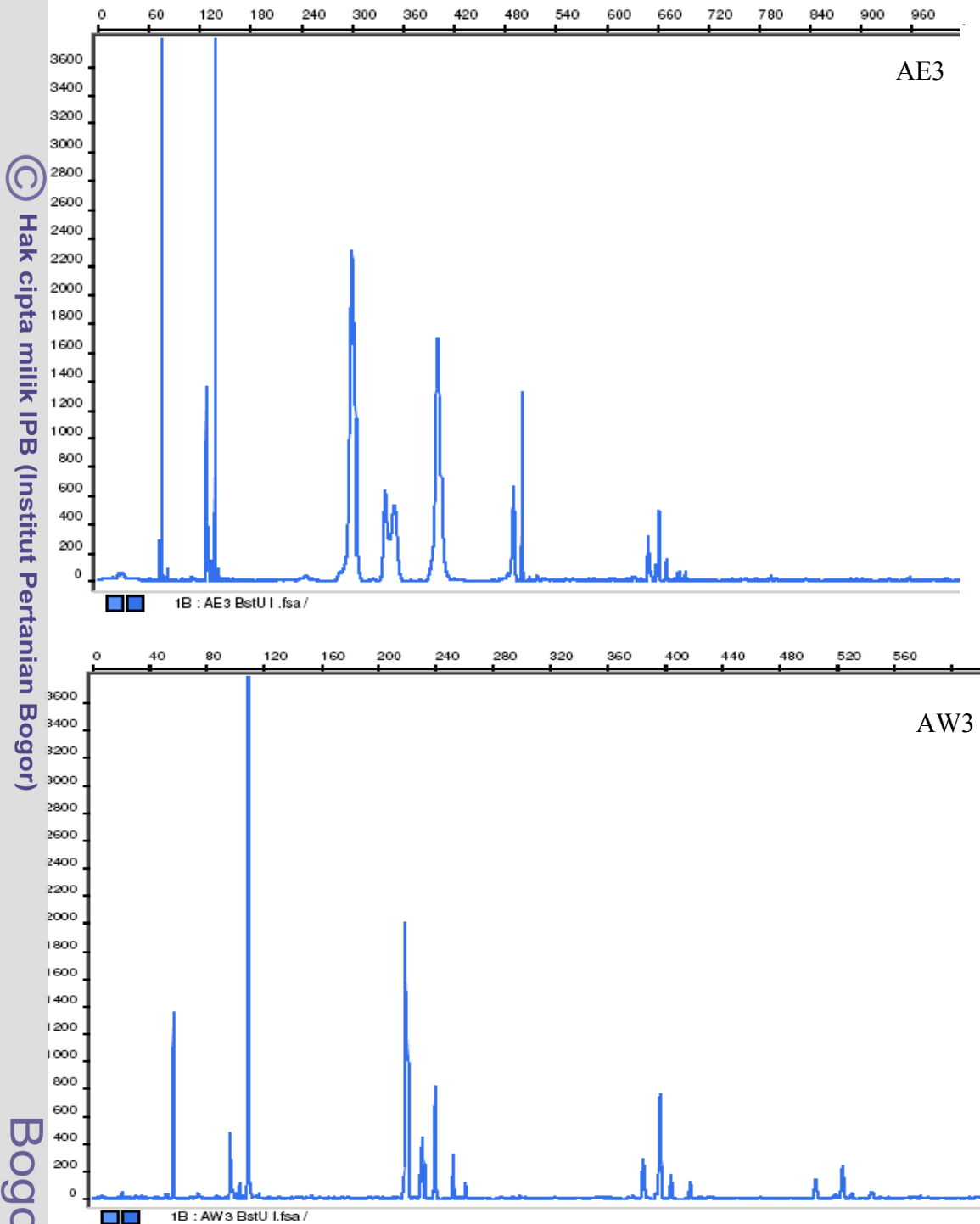
Gambar 11 Profil TRF gen 16S rRNA bakteri AE2 (7 jam perendaman kedelai tempe EMP) dan AW2 (7 jam perendaman kedelai tempe WJB) yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

2. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



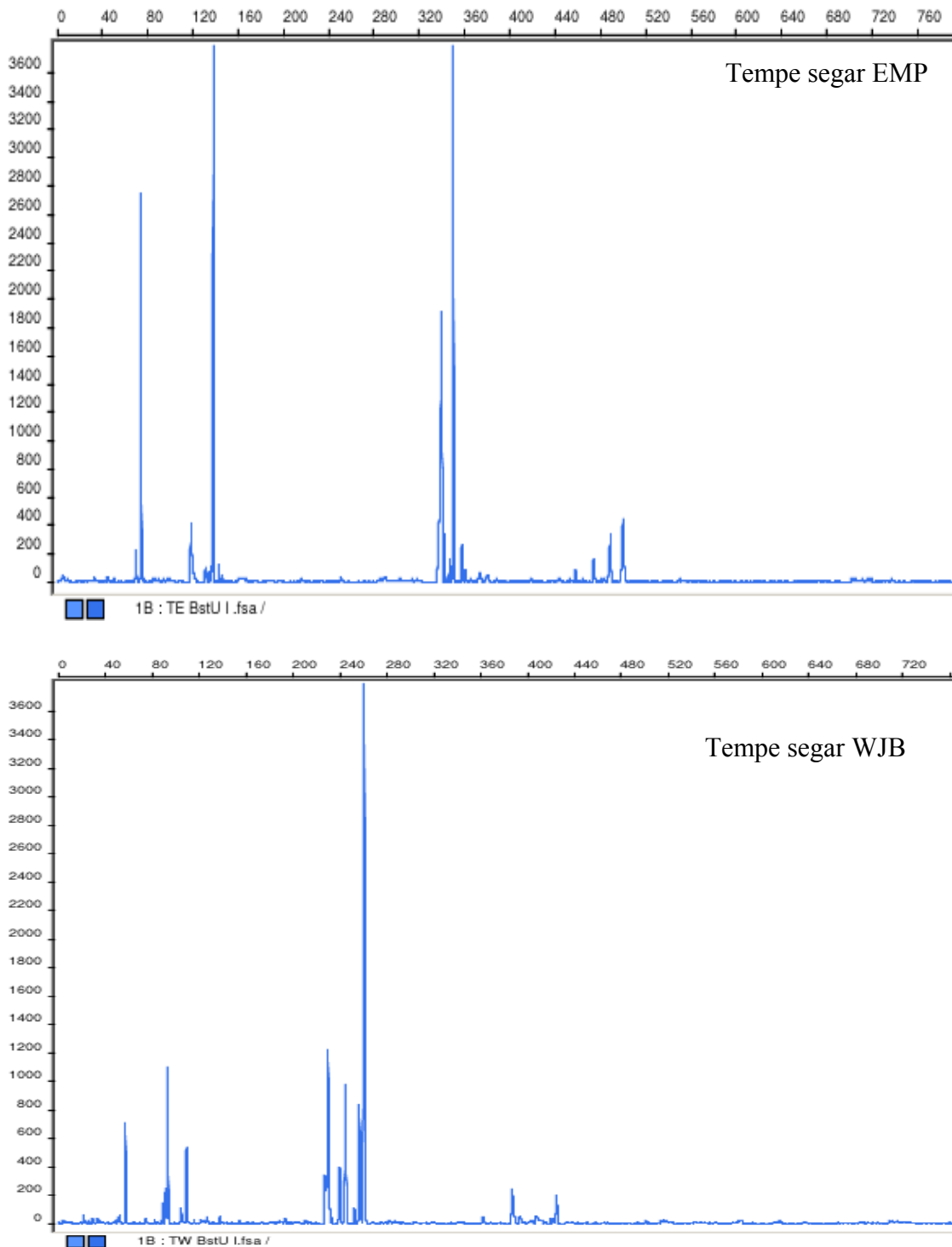
Gambar 12 Profil TRF gen 16S rRNA bakteri AE3 (14 jam perendaman kedelai tempe EMP) dan AW3 (14 jam perendaman kedelai tempe WJB) yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 13 Profil TRF gen 16S rRNA bakteri Tempe segar EMP dan tempe segar WJB yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

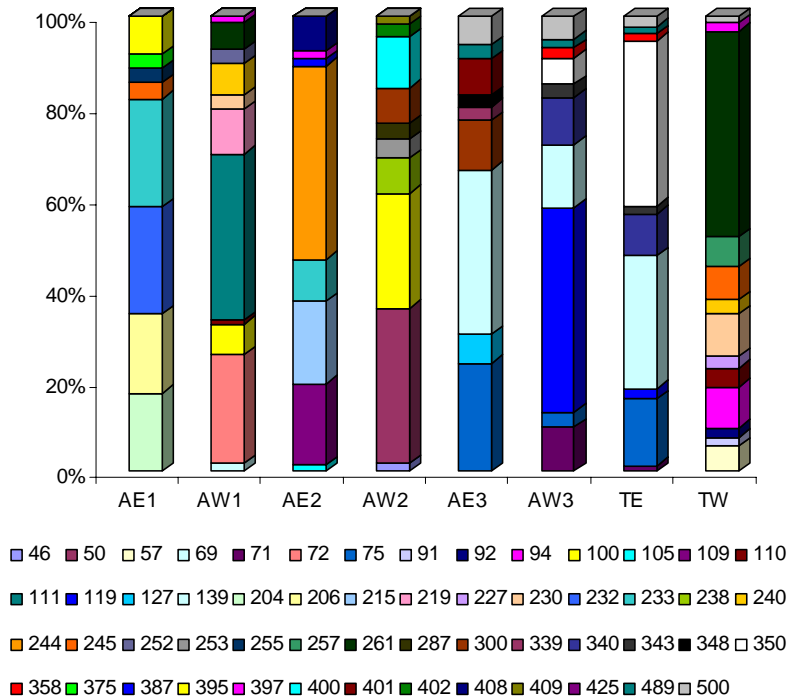
Bogor Agricultural Uni

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

4 Jenis TRF (bp) gen 16S rRNA komunitas bakteri dari air rendaman dan tempe segar EMP dan WJB yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI

No	AE1	AW1	AE2	AW2	AE3	AW3	TE	TW
1	52.54	69.04	56.96	45.68	71.86	52.48	45.56	52.51
2	62.36	71.88	73.27	49.25	74.44	57.08	70.50	57.35
3	73.29	72.48	104.76	50.00	74.94	74.80	75.00	74.71
4	104.73	73.55	108.22	51.14	77.12	87.30	76.01	87.94
5	109.86	76.22	109.12	74.68	82.64	96.86	118.90	89.08
6	163.49	100.00	110.14	90.62	127.00	103.08	131.76	90.80
7	174.11	105.30	121.75	100.00	133.10	108.37	134.40	92.06
8	190.83	108.00	145.21	101.82	134.84	109.32	136.49	93.57
9	199.76	109.82	146.80	238.44	135.98	110.89	139.00	94.73
10	200.86	110.59	214.86	253.06	137.64	116.63	139.48	105.01
11	203.58	111.96	223.21	255.56	139.00	217.15	143.18	109.52
12	206.05	117.31	233.18	287.44	139.39	219.04	146.90	126.98
13	228.14	118.35	243.13	299.80	142.02	220.10	251.18	137.80
14	232.09	118.98	244.44	400.00	142.59	229.39	290.24	193.58
15	233.37	217.68	259.66	402.02	143.30	230.83	340.00	227.29
16	244.95	219.42	266.84	404.43	245.23	238.30	343.15	230.06
17	255.25	229.68	269.52	406.04	290.32	239.75	346.63	233.10
18	269.65	231.19	372.45	408.94	300.00	252.22	349.10	239.97
19	344.54	239.68	386.77		338.76	260.38	350.00	244.83
20	361.58	252.37	395.86		348.13	384.47	357.88	252.44
21	374.50	260.55	397.36		401.00	392.97	360.72	256.59
22	381.62	266.83	408.18		473.77	396.40	373.86	260.50
23	384.72	376.32	422.32		489.49	403.73	379.76	362.26
24	394.96	384.64			500.00	416.96	380.16	386.98
25	408.46	388.43					380.96	393.23
26		393.54					458.07	407.73
27		396.97					473.94	419.82
28		404.21					488.69	421.90
29		465.76					498.09	424.73

Bila dibandingkan jenis TRF pada setiap tahapan, maka pada umumnya jenisnya berbeda (Gambar 14). Ditemukan ada beberapa jenis yang sama (Tabel 5), namun kelimpahan beberapa jenis TRF yang sama tersebut pada umumnya lebih tinggi pada tempe EMP dibandingkan pada tempe WJB (Tabel 5). Perbedaan jenis TRF ini menggambarkan perbedaan jenis bakteri pada kedua jenis tempe.



Gambar 14 Persentase kelimpahan jenis bakteri tempe EMP dan WJB

Tabel 5 Jenis TRF yang sama yang ditemukan pada tempe EMP dan WJB

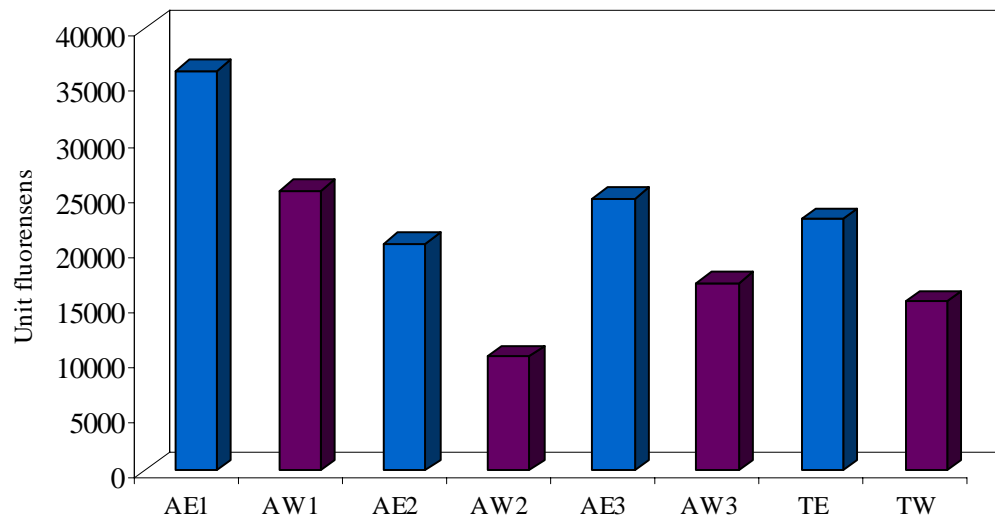
Jenis TRF (bp)	AE1	AW1	AE3	AW3	TE	TW
	(Unit fluoresens)					
75	-	-	5376	512	3130	52
105	337	186	-	-	-	-
110	87	206	-	-	-	-
385	491	251	-	-	-	-

AE1 : 1 jam perendaman kedelai EMP
 AE2 : 7 jam perendaman kedelai EMP
 AE3 : 14 jam perendaman kedelai EMP
 TE : Tempe segar EMP

AW1 : 1 jam perendaman kedelai WJB
 AW2 : 7 jam perendaman kedelai WJB
 AW3 : 14 jam perendaman kedelai WJB
 TW : Tempe segar WJB

Apabila ingin diketahui pengaruh aktivitas bakteri terhadap intensitas rasa pahit tempe, maka tidak cukup hanya dilihat dari keragaman jenis saja. Hal ini karena meskipun jenis bakteri tertentu ada tetapi jika kelimpahan relatifnya sangat rendah, maka pengaruh aktivitasnya terhadap pembentukan rasa pahit pada tempe juga sangat rendah.

Kelimpahan bakteri pada suatu komunitas yang dianalisis dengan teknik T-RFLP dilihat dari intensitas pendaran TRF yang dihasilkan. Oleh sebab itu, apabila dibandingkan pada setiap tahapannya (AE1 dan AW1, AE2 dan AW2, AE3 dan AW3 serta TE dan TW) (Gambar 15) maka keseluruhan tempe EMP memiliki intensitas pendaran TRF yang lebih tinggi. Intensitas pendaran TRF mulai dari air rendaman hingga tempe segar lebih tinggi sekitar 40.85% - 119.42% (Tabel 6) pada EMP dibandingkan dengan pada tempe WJB. Hal ini menggambarkan bahwa kelimpahan bakteri pada EMP lebih tinggi sekitar 40.85% - 119.42%.



AE1 : 1 jam perendaman kedelai EMP
 AE2 : 7 jam perendaman kedelai EMP
 AE3 : 14 jam perendaman kedelai EMP
 TE : Tempe segar EMP

AW1 : 1 jam perendaman kedelai WJB
 AW2 : 7 jam perendaman kedelai WJB
 AW3 : 14 jam perendaman kedelai WJB
 TW : Tempe segar WJB

Gambar 15 Total intensitas TRF pada air rendaman kedelai dan tempe segar EMP dan WJB yang dipotong dengan *Bst*UI.

Tabel 6 Persentase ketinggian kelimpahan bakteri tempe EMP dibandingkan dengan pada tempe WJB.

Contoh	Ketinggian kelimpahan relatif bakteri tempe EMP (%)
AE1 dan AW1	40.85
AE2 dan AW2	119.42
AE3 dan AW3	56.78
TE dan TW	62.85

Jenis dan kelimpahan bakteri pada ekosistem pangan sangat menentukan kualitas bahan pangan hasil fermentasi, karena jenis mikroorganismenya yang berbeda memiliki fungsi yang berbeda-beda, dan sangat penting untuk menentukan kondisi lingkungan selama proses fermentasi tersebut berlangsung (Schwan 1998; Ampe *et al.* 2001; Randazzo *et al.* 2002). Pada pengolahan bahan makanan melalui proses fermentasi, pembentukan cita rasa sangat ditentukan oleh jenis mikroorganismenya yang terlibat.

Proses pengolahan tempe merupakan suatu proses fermentasi yang melibatkan komunitas mikroorganismenya yang kompleks. Dimana baik kapang maupun bakteri masing-masing memiliki peran penting selama proses pengolahan berlangsung. Bahkan selama proses pengolahan tempe yang membutuhkan waktu sekitar 54 jam, selama 18 jam (30%) dari waktu pengolahan, yaitu pada tahapan perendaman kedelai, bakteri merupakan mikroorganismenya yang paling berperan. Oleh sebab itu pendapat yang mengatakan bahwa bakteri merupakan mikroorganismenya “kontaminan” yang menunjukkan kesan bakteri tidak penting pada pengolahan tempe tampaknya kurang tepat.

Sejauh ini peranan berbagai jenis bakteri tersebut sehingga menyebabkan perbedaan intensitas rasa pahit belum dapat dijelaskan dengan pasti. Namun, besarnya perbedaan keragaman dan kelimpahan bakteri selama proses fermentasi kedua jenis tempe tersebut menunjukkan besarnya perbedaan aktivitas bakteri selama proses pengolahan berlangsung, terutama berhubungan dengan keragaman aktivitas enzimatik dari masing-masing jenis bakteri tersebut.

Kacang kedelai sebagai bahan baku pembuatan tempe, mengandung protein sekitar 40% dari total berat kering kedelai (Liu, 1997). Hidrolisis protein pada bahan pangan akan menghasilkan peptida yang mengandung asam-asam amino yang bersifat hidrofobik, dan peptida yang demikian menyebabkan rasa pahit (FitzGerald & Cunin 2006). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa rasa pahit pada hasil hidrolisat kedelai berhubungan dengan terbentuknya peptida tertentu (Kim *et al.* 2003; Reineccius 1994). Selain itu, rasa pahit pada tempe disebabkan juga oleh asam lemak (Hartoyo 1994). Oleh sebab itu, bakteri yang bersifat proteolitik dan bakteri yang menghasilkan enzim yang dapat menghidrolisis lemak diduga berperan penting dalam pembentukan rasa pahit pada tempe pada EMP.

Intensitas rasa pahit yang disebabkan oleh akumulasi jenis peptida tertentu akibat aktivitas proteinase dari *Lactococcus lactis* ditemukan juga pada keju *Cheddar* (Broadbent *et al.* 1998). Flavor rasa pahit pada keju disebabkan karena akumulasi peptida yang bersifat hidrofobik yang melebihi ambang yang dapat dirasakan (Sridhar *et al.* 2005). Selanjutnya, Tan *et al.* (1993) telah melaporkan bahwa aminopeptidase dari *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WG2 dapat menurunkan konsentrasi peptida hidrofobik sehingga secara drastis dapat menurunkan rasa pahit.

Jenis dan kelimpahan bakteri yang terlibat selama proses pengolahan tempe EMP dan tempe WJB berlangsung sangat kompleks, oleh karena itu aktivitas bakteri tersebut juga sangat kompleks mempengaruhi kualitas tempe. Oleh sebab itu, rendahnya intensitas rasa pahit pada tempe WJB dapat juga terjadi karena adanya aktivitas enzim dari mikroorganisme tertentu yang dapat menghidrolisis peptida yang berasa pahit tersebut sehingga rasa pahit menjadi berkurang. Untuk mengurangi rasa pahit peptida hasil hidrolisis protein pada bahan pangan dapat dilakukan dengan menggunakan enzim exopeptidase termasuk amino dan karboksipeptidase (FitGerald & Cunin 2006). Endopeptidase *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 dapat mengurangi rasa pahit pada keju, enzim ini memotong ikatan dekat asam amino hidrofobik sehingga mengurangi rasa pahit (Sridhar *et al.* 2005).

Hasil penelitian ini belum dapat menjelaskan lebih lanjut tentang jenis bakteri yang bersifat proteolitik, lipolitik, dan jenis bakteri yang menghasilkan enzim

peptidase sehingga menyebabkan terjadinya perbedaan intensitas rasa pahit pada tempe EMP dan tempe WJB. Namun, penelitian ini dapat menjadi dasar penelitian lebih lanjut untuk mengkaji lebih detail tentang kontribusi bakteri terhadap flavor tempe. Hal ini penting guna meningkatkan kualitas tempe. Hal yang sama telah dilakukan untuk meningkatkan flavor pada coklat (Schwan 1998).

Perbedaan cara pengolahan tidak berpengaruh terhadap intensitas rasa pahit, namun perbedaan cara pengolahan berpengaruh terhadap kelimpahan bakteri pada tempe (Gambar 15). Pada tempe EMP, setelah perendaman kedelai langsung dicuci dan dikemas, sehingga beberapa jenis bakteri pada air perendaman ditemukan juga secara dominan pada tempe segarnya. Berbeda dengan tempe WJB, setelah perendaman kedelai direbus kembali, sehingga bakteri yang terdapat selama perendaman berlangsung sedikit sekali peluangnya ditemukan pada tempe segarnya.

Untuk mengetahui kemungkinan jenis bakteri sesuai dengan jenis TRFnya dapat dilakukan dengan mencocokkan jenis TRF tersebut dengan *database* (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>). Dari hasil pencocokan akan diketahui kemungkinan jenis bakteri dari jenis TRF tersebut. Namun, keterbatasan teknik analisis dengan T-RFLP ini adalah dalam identifikasi jenis bakterinya. Oleh karena hanya sebagian kecil saja dari ujung/fragmen 5' dari gen 16S rRNA yang dianalisis, maka banyak genus bakteri yang memiliki jenis TRF yang sama, sehingga suatu jenis TRF tertentu akan dimiliki oleh beberapa jenis bakteri.

Penggunaan dua atau lebih jenis enzim restriksi dapat mengurangi banyaknya kemungkinan jenis bakteri pada jenis TRF, sehingga pada penelitian ini digunakan dua jenis enzim restriksi (*Bst*UI dan *Msp*I). Dimana kemungkinan jenis bakteri dari jenis TRF yang diperoleh dari enzim *Bst*UI dicek silang dengan *database* enzim restriksi *Msp*I, yaitu dengan mencocokkan antara jenis TRF-*Bst*UI dengan semua TRF-*Msp*I yang muncul. Namun, walaupun telah menggunakan dua jenis enzim restriksi, kemungkinan jenis bakteri yang muncul tetap masih tinggi.

Kelemahan analisis T-RFLP lainnya adalah terdapat kemungkinan jenis TRF tertentu yang tidak terdapat pada *database*. Jenis TRF tertentu belum ada di *database* sebab analisis komunitas bakteri dengan teknik T-RFLP relatif masih baru, sehingga

sampai saat ini *database* tersebut masih terus dikembangkan. Namun demikian, analisis dengan teknik T-RFLP ini merupakan metode yang dapat untuk membandingkan suatu komunitas bakteri pada habitat berbeda. Hal ini penting untuk mendasari penelitian lebih lanjut tentang tempe, sehingga diketahui jenis bakteri yang merugikan dan jenis bakteri yang menguntungkan. Bila informasi tentang jenis dan peran bakteri pada tempe ini telah diketahui, maka dapat digunakan untuk pengontrolan terhadap jenis bakteri yang merugikan dan memanfaatkan secara maksimal bakteri yang dapat meningkatkan kualitas tempe.

Berdasarkan pencocokan dua jenis TRF tempe EMP dan tempe WJB yang dominan hasil pemotongan dengan enzim *Bst*UI dan dicek silang dengan *Msp*I dengan *database*, maka diperoleh kemungkinan beberapa jenis bakteri pada tempe EMP dan tempe WJB (Tabel 7 dan Tabel 8). Jenis-jenis bakteri yang diperoleh tersebut masih bersifat dugaan karena belum tentu semua jenis bakteri tersebut terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB. Oleh karena kemungkinan jenis bakteri hasil pencocokan tersebut jumlahnya sangat banyak, maka jenis yang ditampilkan dibatasi hanya sampai tingkat genus.

Berdasarkan pencocokan jenis TRF dengan *database* ditemukan bahwa kemungkinan jenis bakteri tempe EMP dan tempe WJB didominasi oleh kelompok bakteri yang bersifat *unculturable*. Hal ini menunjukkan bahwa jenis bakteri yang terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB didominasi oleh jenis bakteri yang sampai saat ini belum berhasil dikultur pada media buatan (*unculturable*). Keberadaan bakteri yang bersifat *unculturable* secara dominan telah juga ditemukan pada proses fermentasi Mexican pozol (Ampe *et al.* 1999), dan pada proses fermentasi vanilla (Roling *et al.* 2003). Selanjutnya, hasil penelitian ini mendukung penelitian Roling *et al.* (2003) yang melaporkan bahwa kelompok bakteri yang bersifat *unculturable* mempengaruhi flavor bahan pangan yang diolah dengan proses fermentasi. Oleh karena jenis bakteri yang bersifat *unculturable* yang diperoleh dari hasil pencocokan TRF dengan *database* tersebut sangat beragam, maka semuanya dikelompokkan menjadi satu sehingga dilaporkan sebagai kelompok bakteri yang bersifat *unculturable* yang selanjutnya disebut bakteri *uncultured* saja (Tabel 7 dan Tabel 8).

Ta 7 Kemungkinan jenis bakteri yang dominan pada tempe EMP berdasarkan analisis T-RFLP menggunakan enzim *Bst*UI

Contoh	Jenis TRF (bp)	Kelimpahan relatif (%)	Kemungkinan jenis bakteri
AE1	233	21.82	<i>Bacillus /Bergeyella /Kurthia /Rubrobacter/ /Sporosarcina /bakteri uncultured</i>
	232	21.60	<i>Bacillus /Brevibacterium /Caloramator /Clostridium /Desulfitobacterium /Nitrospina /Oerskovia /Thermodesulfovibrio /bakteri uncultured</i>
AE2	244	39.60	<i>Desulfomonile /Enterococcus /Lactobacillus /Thermomonospora /bakteri uncultured</i>
	215	17.00	<i>Aeromonas /Frankia /Nocardioides /Pseudoxanthomonas /Stenotrophomonas /bakteri uncultured</i>
AE3	139	33.07	<i>Eubacterium /bakteri uncultured</i>
	75	21.83	<i>Clostridium /Streptococcus /Mycobacterium</i>
	350	33.19	Tidak ada pada <i>database</i>
	139	26.68	<i>Eubacterium /bakteri uncultured</i>

AE1: 1 jam perendaman kedelai EMP
 AE2: 7 jam perendaman kedelai EMP
 AE3: 14 jam perendaman kedelai EMP
 TE : Tempe segar EMP



Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricu

ta Diindungi Undang-Undang sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber: nya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah. rmerupakan kepentingan yang wajar IPB. mban dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Tabel 8 Kemungkinan jenis bakteri yang dominan pada tempe WJB berdasarkan analisis T-RFLP menggunakan enzim *Bst*UI

Contoh	Jenis TRF (bp)	Kelimpahan relatif (%)	Kemungkinan jenis bakteri
AW1	111	33.15	<i>Bacteroidetes/ Clostridium/Cytophaga/Flexibacter/Heliobacillus/Heliobacterium Parabacteroides/Psychroserpens/ Streptococcus/ Tannerella/bakteri uncultured</i>
AW2	72	21.79	<i>Exiguobacterium /bakteri uncultured</i>
AW3	50	32.13	Tidak ada dalam <i>database</i>
	100	23.78	<i>Cyanobacterium /Rhodovibrio /bakteri uncultured</i>
	109	41.24	<i>Alkalilimnicola /alpha proteobacterium /Deferribacter /Dethiosulfovibrio/ Flavobacteriaceae /Flavobacterium/Flexistipes/Formosa/Gelidibacter /Geobacter / Geobacter /Gillisia /Magnetococcus /Maorithyas /Mariprofundus /Pedobacter /Pelobacter /Selenomonas /Sphingobacteriaceae /Sphingobacterium /Sporobacter /Streptococcus /Thermoactinomycetaceae /bakteri uncultured</i>
	219	12.63	<i>Candidatus /Kitasatospora /Rhodococcus /Streptomyces /bakteri uncultured</i>
TW	261	38.3	<i>Meiothermus/ bakteri uncultured</i>
	230	8.5	<i>Ruminococcus/ bakteri uncultured</i>

- AW1 : 1 jam perendaman kedelai WJB
- AW2 : 7 jam perendaman kedelai WJB
- AW3 : 14 jam perendaman kedelai WJB
- TW : Tempe segar WJB

ta Diindungi Undang-Undang sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber: nya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah. rmerupakan kepentingan yang wajar IPB. mban dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Dua jenis bakteri mesofil dari setiap contoh tempe EMP dan tempe WJB yang berhasil ditumbuhkan pada media PCA telah diidentifikasi melalui sekuensing gen 16S rRNA-nya (Tabel 3). Selanjutnya, kedua jenis bakteri tersebut dikonfirmasi keberadaannya pada kemungkinan jenis bakteri hasil analisis T-RFLP pada *database*. Tujuannya untuk mengetahui kelimpahan relatif bakteri tersebut pada kemungkinan jenis bakteri hasil analisis T-RFLP.

Lima dari tujuh jenis bakteri mesofil yang telah diidentifikasi dapat ditemukan pada kemungkinan jenis bakteri hasil T-RFLP. Kelima jenis bakteri tersebut adalah *Acetobacter indonesiensis*, *Bacillus subtilis*, *Flavobacterium* sp, *Pseudomonas putida*, dan *Acetobacter* sp. Dua jenis bakteri lainnya (*Klebsiella* sp., dan *Brevundimonas* sp.) tidak terdeteksi pada kemungkinan jenis bakteri hasil T-RFLP. Kelimpahan *Bacillus* sp. yang lebih tinggi pada tempe EMP dibandingkan dengan tempe WJB diperoleh secara konvensional baik melalui analisis secara konvensional maupun dengan teknik T-RFLP.

Analisis secara konvensional ditemukan bahwa pada tempe EMP, *Acetobacter indonesiensis*, dan *Bacillus subtilis*. kelimpahannya masing-masing sekitar 10^6 CFUml⁻¹ pada air rendaman, dan *Flavobacterium* sp. sekitar 10^8 CFUg⁻¹ pada tempe segar. Demikian juga pada tempe WJB ditemukan *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas putida*, dan *Acetobacter* sp. kelimpahannya masing-masing sekitar 10^1 CFUml⁻¹, 10^6 CFUg⁻¹, 10^3 CFUg⁻¹ (Tabel 3). Kelimpahan bakteri hasil analisis secara konvensional tersebut terdapat hanya dalam jumlah yang kecil pada kemungkinan jenis bakteri hasil TRF (< dari 10%), kecuali *Bacillus* sp. sekitar 21.82% (Tabel 9 dan Tabel 10). Artinya bahwa kelimpahan bakteri total pada tempe EMP dan WJB sesungguhnya terdapat lebih tinggi dari 10^8 CFU yang berhasil dikulturkan secara konvensional pada penelitian ini. Hal ini menggambarkan bahwa keberadaan bakteri selama proses pengolahan tempe sangat kompleks, dan tentu kompleks juga pengaruhnya terhadap cita rasa tempe, khususnya rasa pahit pada tempe. Lebih lanjut, apabila analisis komunitas bakteri pada suatu ekosistem hanya berdasarkan metode konvensional saja, maka analisis tersebut tidak menggambarkan kondisi komunitas bakteri yang sesungguhnya sehingga hasilnya bias.

Jenis dan kelimpahan bakteri sangat menentukan kualitas bahan pangan hasil fermentasi, karena jenis mikroorganisme yang berbeda memiliki fungsi yang berbeda-beda, dan sangat penting untuk menentukan kondisi lingkungan selama proses fermentasi tersebut berlangsung (Schwan 1998, Ampe *et al.* 2001, Randazzo *et al.* 2002). Dengan demikian maka mikroorganisme sangat menentukan cita rasa bahan pangan yang diolah melalui proses fermentasi (Schreier 1992).

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Tempe EMP memiliki intensitas rasa pahit lebih tinggi yang signifikan berbeda dibandingkan dengan tempe WJB. Cara pengolahan tidak berpengaruh secara langsung terhadap perbedaan intensitas rasa pahit antara kedua jenis tempe. Selain itu, perbedaan tersebut bukan disebabkan juga oleh kapang, sebab jenis kapang yang terdapat pada kedua jenis tempe tersebut sama (*R. oligosporus* dan *Mucor* sp.) dengan kelimpahan yang relatif sama, masing-masing sekitar 10^5 CFU g^{-1} dan 10^3 CFU g^{-1} .

Perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB kemungkinan besar disebabkan karena perbedaan kelimpahan dan perbedaan jenis bakteri yang terdapat selama proses pengolahan berlangsung. Berdasarkan teknik konvensional ditemukan kelimpahan bakteri pada air rendaman dan tempe segar EMP sekitar 5×10^3 dan 5×10^2 lebih banyak dibandingkan WJB. *Bacillus* spp. yang bersifat proteolitik ditemukan pada air rendaman kedua jenis tempe, namun kelimpahannya sekitar 9×10^4 kali lebih banyak pada air rendaman tempe EMP dibandingkan dengan WJB. Berdasarkan teknik T-RFLP ditemukan kelimpahan sel bakteri air rendaman tempe EMP lebih banyak sekitar 40%-119%. Perbedaan terbesar (119%) ditemukan setelah tujuh jam perendaman kedelai. Demikian juga kelimpahan sel bakteri tempe segar EMP ditemukan lebih banyak sekitar 62% dibandingkan dengan tempe segar WJB.

Jenis bakteri yang terdapat selama proses pengolahan tempe EMP dan WJB pada umumnya berbeda. Berdasarkan analisis komunitas bakteri dengan teknik T-RFLP ditemukan bahwa jenis bakteri tersebut terdiri atas bakteri yang bersifat *culturable* dan *unculturable*. Namun, jenis bakteri yang bersifat *unculturable* lebih dominan dibandingkan dengan jenis bakteri yang bersifat *culturable*.

Saran

Berdasarkan hasil analisis komunitas bakteri dengan T-RFLP menunjukkan bahwa kemungkinan jenis bakteri yang terlibat selama proses pengolahan tempe sangat banyak. Oleh sebab itu untuk lebih memastikan jenis bakteri tersebut maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan teknik berbasis kloning gen 16S rRNA, yaitu dengan *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analisis* (ARDRA) yang dilanjutkan dengan sekuensing untuk mendapatkan identitas bakteri yang lebih pasti. Selanjutnya, informasi tersebut dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut guna mendapatkan jenis bakteri yang berperan terhadap pembentukan rasa pahit pada tempe.

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

DAFTAR PUSTAKA

- Aghajani EA, Jones K, Holtzman A, Aronson T, Glover N, Boian M, Froman S, Brunk CF. 1996. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *J Clinical Microbiol* 1996: 98-102.
- Ampe F, Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot JP. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* 65:5464-5473.
- Ampe F, Sirvent A, Zakhia N. 2001. Dynamic of microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *Int J Food Microbiol* 65:45-54.
- Astuti M. 1999a. History of the development of tempe. Di dalam: Agranoff J, Sutrisno N editor. *The Complete Handbook of Tempe: The Unique Fermented Soybean of Indonesia*. The American Soybean Association.
- Astuti M. 1999b. Iron availability of tempe and uses in iron deficiency anemia. Di dalam: Agranoff J, Sutrisno N editor. *The Complete Handbook of Tempe: The Unique Fermented Soybean of Indonesia*. The American Soybean Association.
- Blackwood CB, Marsh T, Kim SH, Paul EA. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 69: 926-932.
- Broadbent JR, Barnes M, Brennan C, Strickland M, Houck K, Johnson ME, Steele JL. 2002. Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat cheddar cheese. *Appl Environ Microbiol* 68:1778-1785.
- Cansilla MR, Powell IB, Hillier AJ, Davidson BE. 1992. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrary primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels. *Appl Environ Microbiol* 58:1772-1775.
- Cappuccino JG, Sherman N. 2001. *Microbiology A Laboratory Manual*. New York: Benjamin Cummings.
- Christensen JE, Stencil JA, Reed KD. 2003. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the 16S rRNA gene. *J Clinical Microbiol* 41:3790-3800.



- Coolen MJL, Poste, Catherine C, Davis, Forney LJ. 2005. Characterization of microbial communities found in the human vagina by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 71:8729-8737.
- Cutlar RG. 1992. Genetic Stability and Oxidative Stress: Common Mechanisms in Aging and Cancer. Di dalam *Free Radical and Aging*; Emerit I, Chance B, editor. Switzerland: Birkhauser Erlag.
- Denter J, Rehm HJ, Bisping B. 1998. Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation. *J Food Microbiol* 45:129-134.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1980. Compedium of Soil Fungi. Volume 1. London: Academic Press.
- Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. 2000. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *App Environ Microbiol* 67:197-197.
- Engebretson JJ, Moyer CL. 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *App Environt Microbiol* 69:4823-4829.
- Esaki HH, Onozaki S, Kawakishi, Osawa T. 1996. New antioxidant isolation from Tempe. *J Agric Food Chem* 44: 696-700.
- Felske AA, Wolterink R, vanLis, Akkermans ADL. 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S-rRNA sequences in Drentse A grassland (The Netherlands). *Appl Environ Microbiol* 64:871-879.
- FitzGerald RJ, Cunin BO. 2006. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotech Advances* 24:234-237.
- Giraffa G, Neviani. 2001. DNA-based, culture - independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystem. *J Food Microbiol* 67:19-34.
- Gomez KA, Gomez AA. 1995. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*. Sjamsuddin E, Baharsjah JS, penerjemah; Jakarta: UI Pr; 1995. Terjemahan dari: *Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- Gutell RR, Larsen N, Woese CR. 1994. Lessons From an Evolving rRNA: 16S and 23S rRNA Structure from a Comparative Perspective. *Microbiol Rev* 58:10-26.

- Hagedorn S, Kaphammer B. 1994. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Ann Rev Microbiol* 48:773-800.
- Han BZ, Kiers JL, Nout MJR. 1999. Solid-substrate fermentation of soybean with *Rhizopus* spp.: Comparison of discontinuous rotation and stationary bed fermentation. *J Biosci Bioeng* 88:205-209.
- Hartoyo LK. 1994. Usaha mengurangi rasa pahit pada tepung tempe dari bahan mentah tempe kedelai produksi beberapa pengrajin tempe di Bogor [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Hermana, Karmini M. 1996. Pengembangan teknologi pembuatan tempe. *Di dalam* Sapuan & N. Sutrisno (eds.). Bunga rampai tempe Indonesia. Yayasan Tempe Indonesia, Jakarta.
- Hesseltine CW 1985. Genus *Rhizopus* and tempeh microorganisms. *Di dalam: Asian Symposium on non-salted soybean fermentation; Tsukuba, July. 1985.*
- Hunter – Cevera, JC. 1998. The value of microbial diversity. *J Microbiol* 1:278-285.
- Jutono 1985. The microbiology of usar, a traditional tempe inoculum. *Di dalam: Asian Symposium on non-salted soybean fermentation; Tsukuba, July. 1985.*
- Karyadi D, Hermana H. 1995. Potensi tempe untuk gizi dan kesehatan. *Di dalam: Pengembangan Tempe dalam Industri Pangan Modern. Prosiding Simposium Nasional; Universitas Gajah Mada 15-16 Apr 1995.* Yogyakarta: Yayasan Tempe Indonesia.
- Karyadi D. 1996. Perkembangan Tempe di Lima Benua *Di dalam: Bunga Rampai Tempe Indonesia.* Penerbit Yayasan Tempe Indonesia.
- Kasmidjo R. 1995. Teknologi Pembuatan Tempe sebagai Dasar Pengembangan Industri Tempe Modern *Di dalam: Pengembangan Tempe dalam Industri Pangan Modern.* Universitas Gajah Mada 15-16 Apr 1995. Yogyakarta: Yayasan Tempe Indonesia.
- Kent AD, Triplett EW. 2002. Microbial communities and their interaction in soil and rhizosphere ecosystems. *Ann Rev Microbiol* 56:211-236.
- Keuth S, Bisping B. 1994. Vitamin B₁₂ production by *Citrobacter freundii* or *Klebsiella pneumoniae* during tempeh fermentation and proof of enterotoxin absence by PCR. *J Appl Environ Microbiol* 60:1495-1499.
- Kim MR, Kawamura Y, Lee CH. 2003. Isolation and identification of bitter peptides of tryptic hydrolysate of soybean 11S glycinin by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Food Sci* 68: 2416-2422.

- Klus K, Borger-Papendorf G, Barz W. 1993. Formation of 6,7,4 trihydroxyisoflavone (factor 2) from soybean seed isoflavones by bacteria isolated from tempe. *J Phytochem* 34:979-981.
- © Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor) Ko SD. 1985. Some microbiological aspects of tempe. Di dalam: Asian Symposium on Non-Salted Soybean Fermentation. Tsukuba. July. 1985.
- Liu K. 1997. *Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization*. New York: International Thomson Publishing.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. 1997. Characterization of microbial diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *App Environ Microbiol* 63:4516-4522.
- Lukow T, Dunfield PF, Liesack W. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within agricultural soil planted with transgenic and non transgenic potato plants. *FEMS Microbiol Ecol* 32: 241-247.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64:795-799.
- Marsh TL. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opinion Microbiol* 2: 323-327.
- Mashall WE. 1990. Methods to remove bitterness. Di dalam: Rouseff, R.L, editor. *Bitterness in Foods and Beverages*. Amsterdam: Elsevier.
- Murata K. 1985. Formation of antioxidants and nutrients in tempe. Di dalam: Asian Symposium on Non-Salted Soybean Fermentation. Tsukuba. July. 1985.
- Myong JC, Unklesbay N, Hsieh FH, Clarke AD. 2004. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 52:5895-5901.
- MyungYL, Hong KN, Soon DK, Prinyawiwatkul W. 2007. Quality of chungkukjangs prepared with various *Bacillus* strains. *Int J Food Sci Technol* 42:587-592.
- Nout MJR, Kiers JI. 2005. Tempe fermentation, innovation, and functionality: update into the third millenium. *App Environ Microbiol* 98:789-805.

- Omafuvbe BO, Abiose SH, Shonukan OO. 2002. Fermentation of soybean (*Glycine max*) for soy-daddawa production by starter cultures of *Bacillus*. *J Food Microbiol* 19:561-566.
- Pace NR. 1996. New Perspective On the Natural Microbiol Word: Molecular Microbiol Ecology. *ASM News*. 62:463-470.
- Pawiroharsono, S. 1994. Penggunaan Isolat untuk Peningkatan kualitas Makanan Fermentasi Tempe. Makalah disampaikan pada presentasi ilmiah Peneliti BPP Teknologi, pada tanggal 13 April 1994, di Jakarta.
- Randazzo CL, Toriani S, Akkermans DADL, de Vos WM, Vaughan EE. 2002. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal sisilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 68:1882-1892.
- Reineccius G. 1994. Source Book of Flavor. New York: Chapman & Hall.
- Rifai, MA. 1973. Kunci Kerja untuk Mendeterminasi Jenis-Jenis *Rhizopus* Indonesia. Kongres Nasional Mikrobiologi I. ITB. Bandung.
- Rodas AM, Ferrer S, Pardo I. 2003. 16S-ARDRA: A tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *J Syst Appl Microbiol* 26: 412-422.
- Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Bruce KD. 2004. Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clinical Microbiol* 42:5176-5183.
- Roling WFM, Kerler J, Braster M, Apriyanto A, Stam H, vanVerseveld HW. 2003. Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Appl Environ Microbiol* 67:1995-2003.
- Rouseff RL. 1990. Introduction to bitterness Di dalam: Rouseff, R.L, editor. *Bitterness in Foods and Beverages*. Amsterdam: Elsevier.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Moleculer Cloning, A Laboratory Manual*. Ed. Ke-3. Cold Spring Harbor Laboratory Pres. New York.
- Satrio BE. 27 Januari 2008. Tempe, tidak sepele. Kompas hal 18 (1-7).
- Schwan RF. 1998. Cocoa fermentation conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl Environ Microbiol* 64:1477-1483.



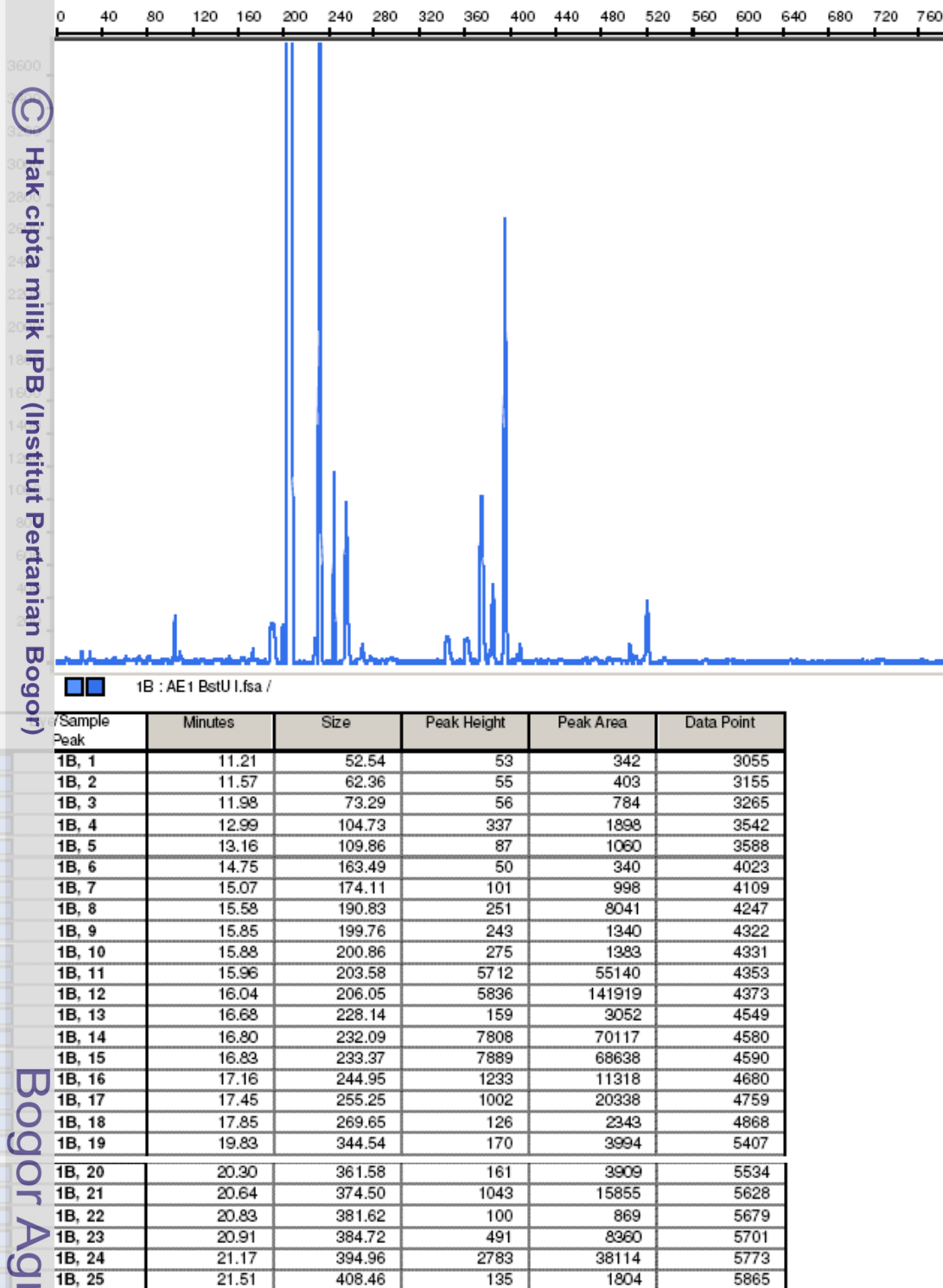
- Seumahu CA, Suwanto A, Suhartono MT. 2005. Dinamika populasi *Acetobacter* selama proses fermentasi *nata de coco*. *J Mikrobiol Indones* 2:17-21
- Sparringa RA, Owens JD. 1999. Protein utilization during soybean tempe fermentation. *J Agric Food Chem* 47:4375-4378.
- Sridhar VR, Hughes JE, Welker DL, Broadbent JR, Steele JL. 2005. Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptidase. *Appl Environ Microbiol* 7:3025-3032.
- Stahnke LH. 1994. Aroma component from dried sausages fermented with *Stapylococcus xylosus*. *J Meat Sci* 38:39-53.
- Sudigbia I. 1999. Tempe in the management of infant diarrhea in Indonesia. Di dalam: Agranoff J, Sutrisno N editor. *The Complete Handbook of Tempe: The Unique Fermented Soybean of Indonesia*. The American Soybean Association.
- Suhartono MT. 1992. Protease. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Suwanto A. 1994. Evolusi Mikroba dan Kaitannya dengan Sistemik Molekuler. *Hayati*. 12:26-31.
- Tan PS, van Kessel AJM, van de Veerendonk M, Zuurendonk PF, Bruins AP, Konings WN. 1993. Degradation and debittering of a tryptic digest from β -casein by aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WG2. *Appl Environ Microbiol* 59:1430-1436.
- Tiedje JM, Asumsing-Brempong S, Nusslein K, Marsh TL, Flynn SJ. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol* 13:109-122.
- Winarno FG. 1985. Tempe Making on Various Substrates. Di dalam: Asian Symposium on Non-Salted Soybean Fermentation. Tsukuba. July. 1985.
- Yogiara. 2004. Analisis komunitas bakteri cairan kantung semar (*Nepenthes* spp.) menggunakan teknik *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) dan *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA). [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

LAMPIRAN

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 1 Hasil analisis TRFLP air rendaman pertama (AE1) tempe EMP yang dipotong dengan enzim *Bst*UI



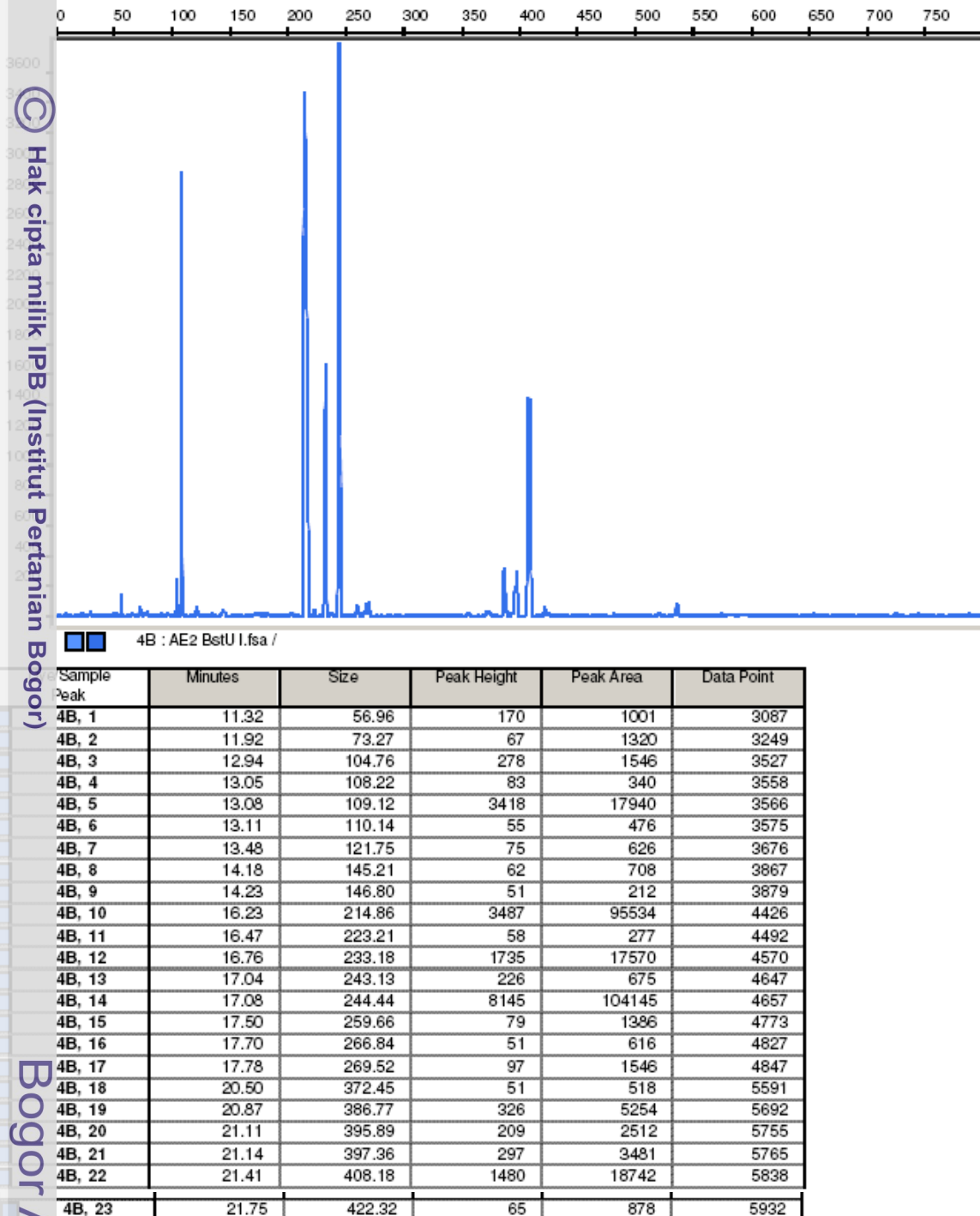
Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

1. Diarangi mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Diarangi mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 2 Hasil analisis TRFLP air rendaman kedua (AE2) tempe EMP yang dipotong dengan enzim *Bst*UI



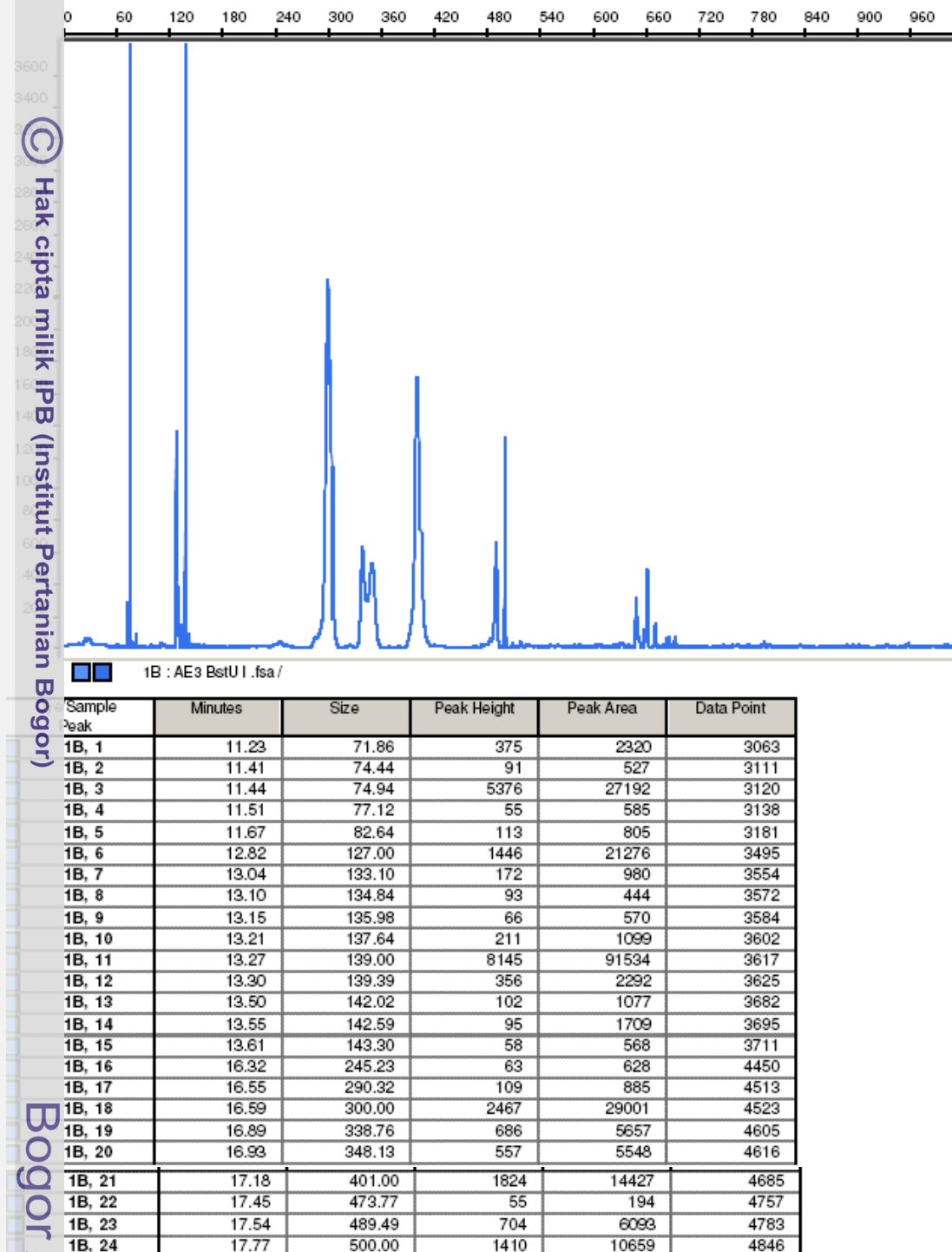
Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

1. Diarangi mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Diarangi mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 3 Hasil analisis TRFLP air rendaman ketiga (AE3) tempe EMP yang dipotong dengan enzim *Bst*UI



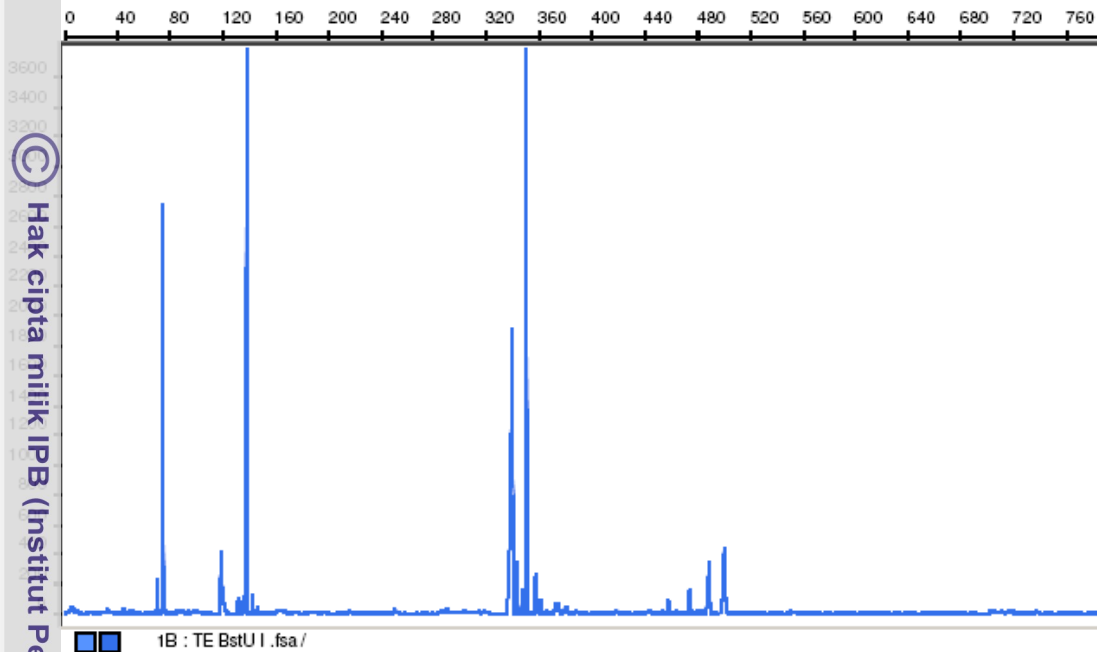
Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

2. Diwajibkan mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.
3. Diwajibkan mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

Lampiran 4 Hasil analisis TRFLP tempe segar EMP (TE) yang dipotong dengan enzim *Bst*UI



Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1B_1	10.34	45.56	50	422	2819
1B_2	11.22	70.50	258	2173	3060
1B_3	11.43	75.00	3130	16628	3117
1B_4	11.47	76.01	61	504	3126
1B_5	12.32	118.90	481	3970	3360
1B_6	12.56	131.76	113	829	3425
1B_7	12.61	134.40	95	481	3439
1B_8	12.65	136.49	143	963	3450
1B_9	12.70	139.00	6194	32972	3463
1B_10	12.75	139.48	100	801	3475
1B_11	13.22	143.18	144	1005	3604
1B_12	13.82	146.90	61	1184	3767
1B_13	15.33	251.18	51	398	4179
1B_14	15.84	290.24	54	585	4318
1B_15	16.42	340.00	1964	33009	4476
1B_16	16.63	343.15	378	2634	4534
1B_17	16.95	346.63	178	1914	4621
1B_18	17.20	349.10	142	1091	4690
1B_19	17.29	350.00	7705	90317	4715
1B_20	17.62	357.88	309	3095	4805
1B_21	17.73	360.72	106	736	4835
1B_22	18.18	373.86	75	1717	4958
1B_23	18.36	379.76	59	672	5005
1B_24	18.37	380.16	60	159	5008
1B_25	18.39	380.96	71	629	5014
1B_26	20.48	458.07	100	1047	5585
1B_27	21.14	473.94	176	2840	5764
1B_28	21.71	488.69	362	6508	5919
1B_29	21.97	498.09	104	655	5991
1B_30	22.01	499.85	470	5776	6003

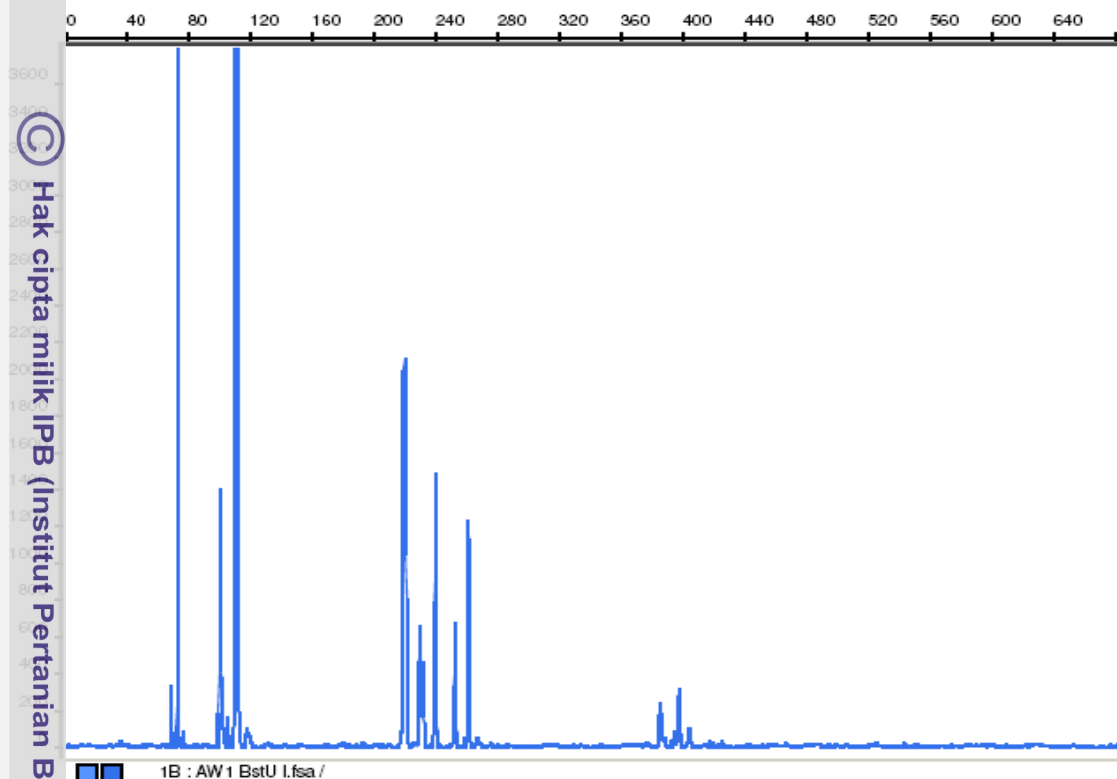
Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

1. Diarangi mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Diarangi mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 5 Hasil analisis TRFLP air rendaman pertama (AW1) tempe WJB yang dipotong dengan enzim *Bst*UI



Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1B_1	11.22	69.04	398	2137	3059
1B_2	11.39	71.88	90	458	3104
1B_3	11.42	72.48	5524	26830	3114
1B_4	11.49	73.55	56	679	3132
1B_5	11.64	76.22	102	851	3174
1B_6	12.79	100.00	1549	16433	3488
1B_7	13.01	105.30	186	1079	3547
1B_8	13.12	108.00	76	485	3576
1B_9	13.19	109.82	206	850	3595
1B_10	13.21	110.59	8401	84852	3603
1B_11	13.27	111.96	220	1924	3617
1B_12	13.46	117.31	117	896	3670
1B_13	13.50	118.35	77	361	3680
1B_14	13.52	118.98	83	1511	3686
1B_15	16.50	217.68	98	924	4499
1B_16	16.55	219.42	2267	26227	4513
1B_17	16.85	229.68	709	5477	4595

...					
1B_18	16.90	231.19	483	4486	4607
1B_19	17.14	239.68	1602	11973	4674
1B_20	17.50	252.37	730	5455	4773
1B_21	17.74	260.55	1336	9346	4836
1B_22	17.91	266.83	56	1274	4884
1B_23	20.87	376.32	59	272	5691
1B_24	21.09	384.64	251	3884	5751
1B_25	21.19	388.43	62	491	5778
1B_26	21.32	393.54	96	1056	5814
1B_27	21.41	396.97	336	3648	5838
1B_28	21.59	404.21	120	1623	5888
1B_29	23.11	465.76	56	283	6303

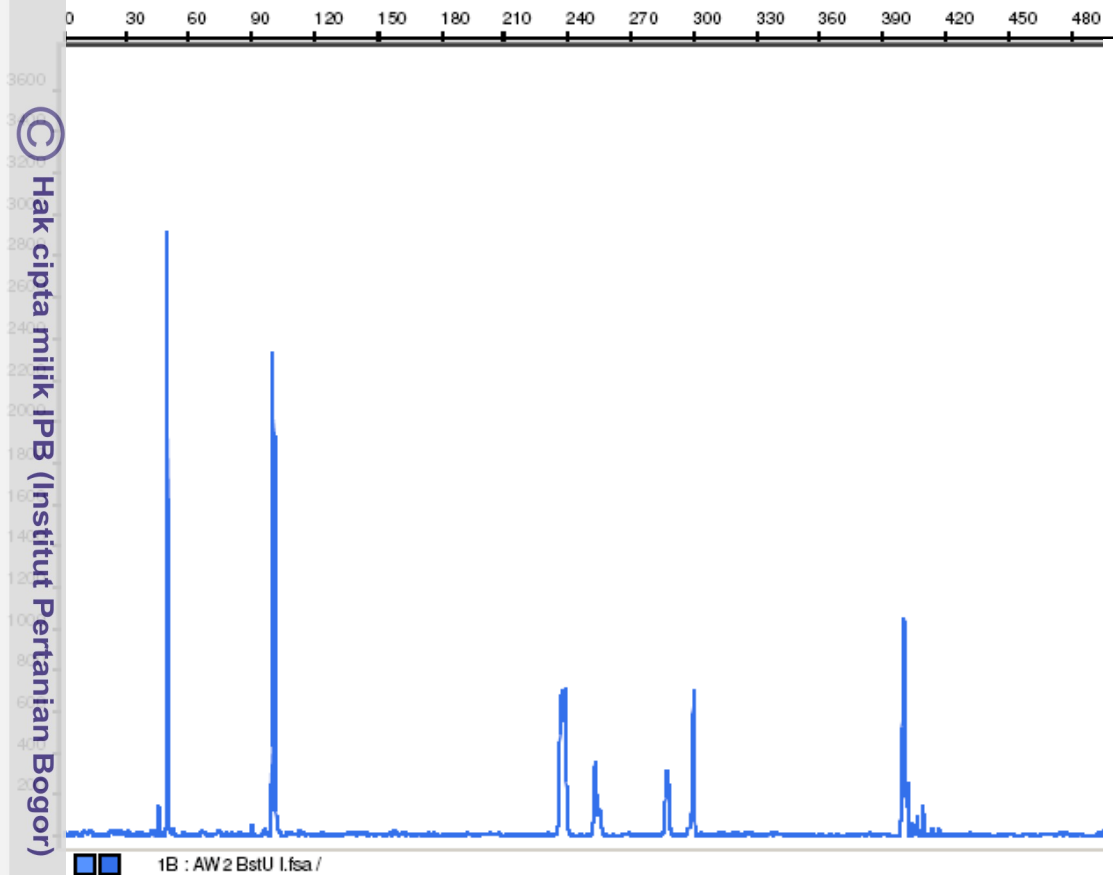
Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

1. Diarangi mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Diarangi mengumbar dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 6 Hasil analisis TRFLP air rendaman kedua (AW2) tempe WJB yang dipotong dengan enzim *Bst*UI



Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1B, 1	11.26	45.68	166	1054	3071
1B, 2	11.44	49.25	55	283	3119
1B, 3	11.47	50.00	3322	16645	3128
1B, 4	11.51	51.14	57	546	3137
1B, 5	12.14	74.68	55	568	3311
1B, 6	12.86	90.62	63	852	3507
1B, 7	13.28	100.00	2459	20858	3622
1B, 8	13.33	101.82	52	537	3635
1B, 9	16.67	238.44	769	9632	4545
1B, 10	16.94	253.06	394	3313	4619
1B, 11	16.99	255.56	140	1242	4632
1B, 12	17.60	287.44	345	2616	4800
1B, 13	17.83	299.80	751	5975	4863
1B, 14	21.21	400.00	1100	12943	5783
1B, 15	21.31	402.02	276	3653	5812
1B, 16	21.45	404.43	70	766	5849
1B, 17	21.55	406.04	104	1369	5875
1B, 18	21.73	408.94	163	1801	5925

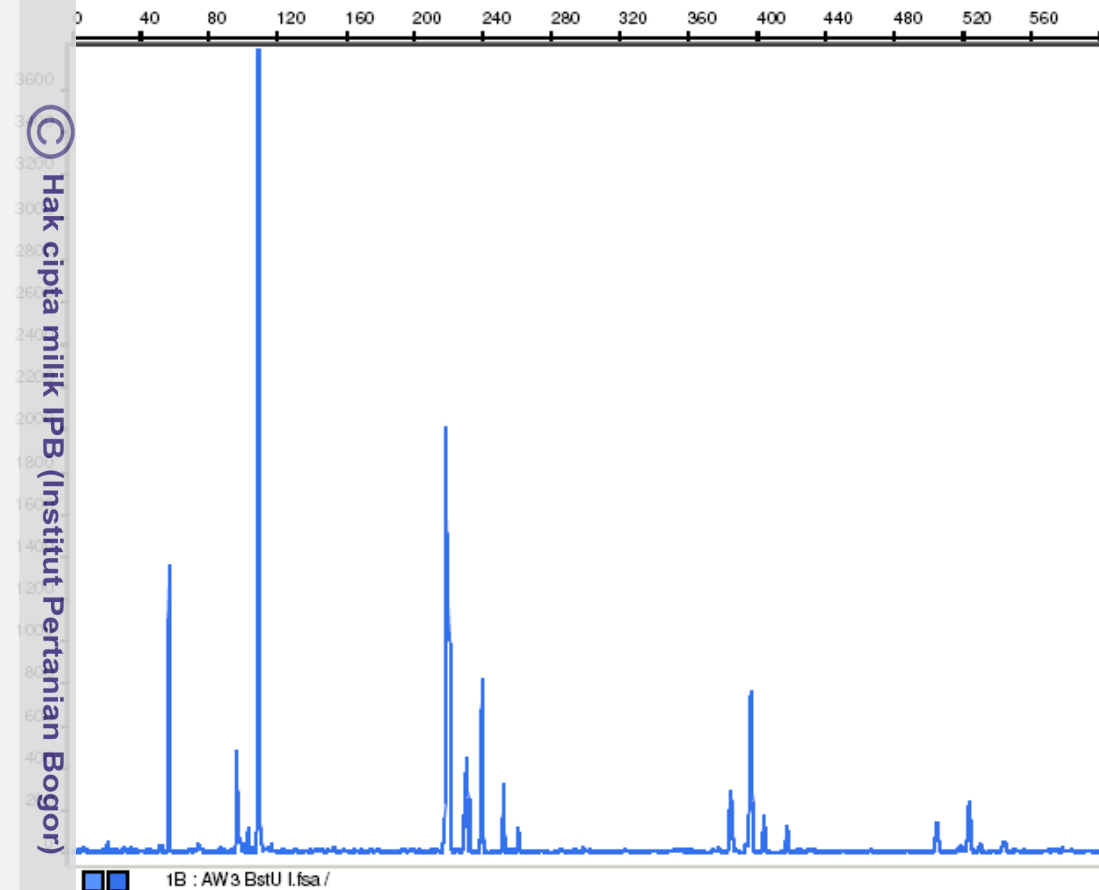
Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

- a. Diarangi mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Diarangi mengumbar dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 7 Hasil analisis TRFLP air rendaman ketiga (AW3) tempe WJB yang dipotong dengan enzim *Bst*UI



Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1B, 1	11.79	52.48	51	373	3214
1B, 2	11.99	57.08	1524	8132	3268
1B, 3	12.68	74.80	52	873	3457
1B, 4	13.11	87.30	50	279	3575
1B, 5	13.43	96.86	512	6124	3662
1B, 6	13.64	103.08	132	893	3720
1B, 7	13.83	108.37	94	463	3771
1B, 8	13.86	109.32	7003	65079	3780
1B, 9	13.92	110.89	105	963	3795
1B, 10	14.12	116.63	63	505	3849
1B, 11	17.30	217.15	71	608	4718
1B, 12	17.36	219.04	2145	15834	4734
1B, 13	17.39	220.10	1611	12212	4743
1B, 14	17.68	229.39	183	1498	4821
1B, 15	17.72	230.83	464	5995	4833
1B, 16	17.95	238.30	77	476	4895
1B, 17	18.00	239.75	888	6616	4907
1B, 18	18.37	252.22	364	2807	5009
1B, 19	18.61	260.38	138	1267	5075
1B, 20	22.15	384.47	294	4705	6040
1B, 21	22.38	392.97	60	680	6103
1B, 22	22.47	396.40	776	10308	6128
1B, 23	22.67	403.73	186	2097	6181
1B, 24	23.02	416.96	138	1524	6276

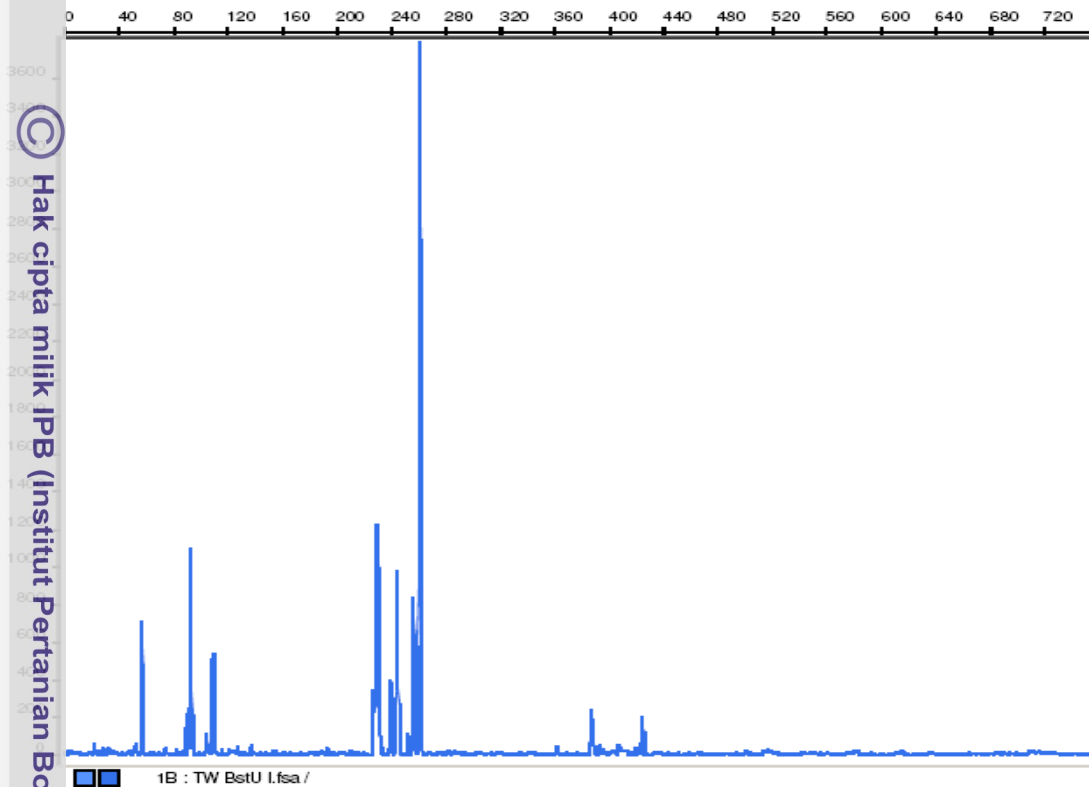
Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

2. Diarangi mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
3. Diarangi mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 8 Hasil analisis TRFLP tempe segar WJB (TW) yang dipotong dengan enzim *Bst*UI



Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1B, 1	11.27	52.51	85	1144	3072
1B, 2	11.45	57.95	781	4954	3122
1B, 3	12.11	74.71	52	848	3301
1B, 4	12.54	87.94	52	165	3420
1B, 5	12.58	89.08	163	1053	3430
1B, 6	12.64	90.80	264	1298	3445
1B, 7	12.68	92.06	287	1669	3456
1B, 8	12.72	93.57	1277	6814	3469
1B, 9	12.76	94.73	74	371	3479
1B, 10	13.09	105.01	134	884	3570
1B, 11	13.24	109.52	577	4888	3611
1B, 12	13.81	126.98	65	599	3765
1B, 13	14.15	137.80	70	588	3857
1B, 14	15.79	193.58	59	531	4306
1B, 15	16.80	227.29	358	4611	4580
1B, 16	16.88	230.06	1310	12956	4602
1B, 17	16.97	233.10	73	305	4626
1B, 18	17.16	239.97	444	3635	4680
1B, 19	17.30	244.83	1032	10287	4718
1B, 20	17.52	252.44	135	978	4777
1B, 21	17.64	256.59	914	6935	4809
1B, 22	17.75	260.50	6349	50783	4839
1B, 23	20.50	362.26	58	706	5591
1B, 24	21.16	386.98	254	3688	5771
1B, 25	21.33	393.23	73	894	5815
1B, 26	21.69	407.73	68	1165	5915
1B, 27	21.99	419.82	56	413	5997
1B, 28	22.04	421.90	54	490	6011
1B, 29	22.11	424.73	212	2095	6030

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural Uni

1. Diarangi mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Diarangi mengumbar dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 9 Contoh formulir pengujian intensitas rasa pahit tempe

Nama :
Telp/Hp :
Tanggal :

Instruksi umum: Anda diminta untuk menilai intensitas rasa pahit sampel berikut ini dengan cara membandingkannya dengan intensitas rasa pahit standar.

Instruksi Khusus:

1. Ciciplah satu sendok larutan standar selama 3 detik, (mulai dari standar yang lebih lemah) lalu netralkan dengan air putih sebelum mencicip larutan standar berikutnya.
2. Ciciplah sampel dan biarkan di dalam mulut selama 5 detik.
3. Berikan penilaian terhadap intensitas rasa pahit sampel dengan memberikan tanda (X) pada skala garis di bawah ini.
4. Netralkan mulut dengan air putih dan cracker, kemudian istirahatlah 5 detik sebelum mencicip sampel berikutnya.

Kode sampel
862

Lemah	1	3	kuat
-------	---	---	------

Kode sampel
245

Lemah	1	3	Kuat
-------	---	---	------

Kode sampel
458

Lemah	1	3	Kuat
-------	---	---	------

Kode sampel
396

Lemah	1	3	Kuat
-------	---	---	------

Kode sampel
498

Lemah	1	3	Kuat
-------	---	---	------

Terima Kasih

Lampiran 10 Contoh formulir uji penentuan rasa dasar

UJI DESKRIPSI RASA

Nama :
Telp/ Hp :
Tanggal :

Instruksi umum: Anda diminta untuk mengidentifikasi dan menuliskan jenis rasa yang identik antara sampel set I dan set II.

Instruksi Khusus:

1. Ciciplah satu sendok sampel pada set I selama 3 detik, lalu telan.
2. Tuliskan rasa yang berhasil anda identifikasi di kolom jenis rasa.
3. Netralkan dengan air putih, istirahatlah selama 30 detik sebelum mencicip sampel berikutnya.
4. Setelah semua sampel pada set I diidentifikasi, ulangi pada set II
5. Tuliskan kode sampel set II yang rasanya identik dengan set I.

Kode sampel set I	Jenis rasa	Kode sampel dengan rasa identik pada set II
862
245
458
396
522

Terima kasih

Lampiran 11 Contoh formulir uji segitiga rasa

UJI SEGITIGA RASA PAHIT

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Nama :
Telp/Hp :
Tanggal :

Instruksi umum: Anda diminta untuk menentukan satu sampel yang berbeda dari tiga sampel yang disajikan pada setiap set.

Instruksi Khusus:

1. Ciciplah satu sendok sampel pada set I selama 3 detik, lalu telan.
2. Minum air putih dan istirahat 30 detik sebelum mencicipi sampel berikutnya.
3. Setelah semua sampel set I diidentifikasi, tentukan sampel yang berbeda dari tiga sampel yang disajikan.
5. Berilah tanda \surd pada kolom respon untuk sampel yang berbeda.
6. Ulangi kegiatan 1-5 di atas untuk pengujian set II dan III berikutnya.

Set Pengujian	Kode Sampel	Respon
I	266	
	954	
	756	
II	183	
	398	
	223	
III	458	
	245	
	862	

Terima Kasih

Lampiran 12 Contoh formulir uji ranking rasa pahit

UJI RANKING RASA PAHIT

Nama :
Telp/ Hp :
Tanggal :

Instruksi umum: Anda diminta untuk meranking intensitas rasa pahit sampel berikut.

Instruksi Khusus:

1. Ciciplah satu sendok sampel pada set I selama 3 detik, lalu telan.
2. Minumlah seteguk air putih sebagai penetral sebelum mencicip sampel berikutnya.
3. Tuliskan kode sampel mulai dari yang paling pahit hingga yang paling tidak pahit.
4. Ulangi kegiatan 1-3 di atas untuk pengujian set II berikutnya.

Set I : Paling pahit Kode sampel

.....

.....

Paling tidak pahit

Set II : Paling pahit Kode sampel

.....

.....

Paling tidak pahit

Terima kasih